



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

(21) PI 0716225-1 A2



(62) Data de Depósito do Pedido Original:
PI0621691 - 19/12/2006

(22) Data de Depósito: 31/08/2007

(43) Data da Publicação: 15/10/2013
(RPI 2232)

(51) Int.Cl.:

C12N 15/82

(54) Título: MÉTODOS PARA A TRANSFORMAÇÃO RÁPIDA DE PLANTAS MONOCOTILEDÔNEAS

(30) Prioridade Unionista: 31/08/2006 US 60/841,519

(73) Titular(es): Monsanto Technology LLC

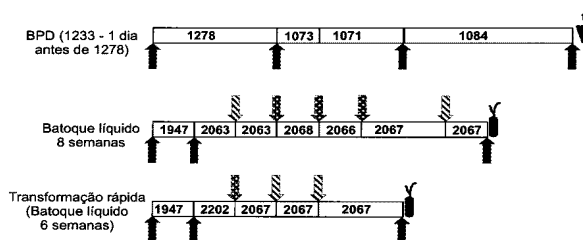
(72) Inventor(es): Anne Spelletich, Brenda Lowe, John Purcell, Jyoti R. Rout, Melissa Way, Michael Spencer

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007077366 de 31/08/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/028119 de 06/03/2008

(57) Resumo: MÉTODO E APARELHO PARA TRANSMITIR DADOS. Uma implementação fornece um transmissor que separa porções sequenciais de dados em um primeiro conjunto de dados por intervalos de tempo permitindo um modo de economia de energia (1005). O transmissor transmite as porções sequenciais de dados separadas por respectivos intervalos de tempo tendo comprimentos configurados para permitir um receptor entrar e sair de um modo de economia de energia entre as porções de dados de recepção sequencialmente transmitidas do primeiro conjunto de dados (1010). O transmissor separa as porções sequenciais de dados em um segundo conjunto por intervalos de tempo que não são de comprimento suficiente para permitir um receptor entrar e sair de um modo de economia de energia durante os intervalos de tempo (1015). O segundo conjunto de dados é depois transmitido (1020).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA A TRANSFORMAÇÃO RAPIDA DE PLANTAS MONOCOTILEDÔNEAS"**.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5 Este Pedido de Patente reivindica a prioridade do Pedido De Patente Provisória U.S. Nº Serial 60/841.519, depositado em 31 de agosto de 2006, a descrição total do qual fica incorporada aqui por referência.

1. Campo da Invenção

10 A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia de plantas. Mais especificamente, ela se relaciona a métodos aperfeiçoados para a transformação de monocotiledôneas com um gene de interesse.

2. Descrição da Técnica Anteriores

15 As abordagens com base em processos genômicos em biotecnologia de plantas têm permitido a identificação e o isolamento de uma grande quantidade de genes e se faz necessário a sistemas de produção de alta transformação confiáveis e eficientes para testar a utilidade desses genes através da transformação dos mesmos em monocotiledôneas importantes economicamente tais como o milho. A transformação de monocotiledôneas mediada pela *Agrobacterium* tais como o milho, arroz e trigo é uma

20 abordagem experimental amplamente usada, quase sempre com o uso de tecido do meristema tais como embriões imaturos como as ex-plantas de escolha (como, por exemplo, Ishida *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001; Frame *et al.*, 2002). Para o arroz, a transformação de sementes embebidas também tem sido registrada (Toki *et al.*, 2006). Até o presente, os métodos mais co-

25 muns que seguem o contato de células com a *Agrobacterium* incluem: cultura do tecido da ex-planta tal como os embriões imaturos ("cocultura"), incluindo possivelmente uma etapa de "retardo" ou "descanso" (não seletiva), e seguida pela cultura em meio de seleção que contenha auxina(s), permitindo a desdiferenciação de células para a formação da callus. Durante essa fase

30 de formação do callus, o tecido de callus resistente transformado é selecionado na presença de um agente de seleção apropriado em um meio de seleção. Isso é seguido pelo cultivo das células sob condições que promovam

a diferenciação dos callus e a regeneração dos callus em plantas em meio de regeneração ou de formação de raiz. Este processo tem exigido tipicamente pelo menos de 10 a 12 semanas para a produção de plantas que possam ser transferidas para o solo para o crescimento posterior. O processo também exige várias transferências manuais do tecido através de todo o processo de transformação e usa vários tipos diferentes de meios.

Desse modo, o uso de protocolos padronizados de transformação e de regeneração é consumidor de tempo e ineficiente, e tem um impacto negativo na linha do desenvolvimento do produto transgênico, dado que existe usualmente uma "janela de prioridade de desenvolvimento" limitada sazonalmente, para a tomada de decisões em relação com os construtos genéticos para priorizar em relação ao uso do trabalho de transformação em escalas maiores com base nos resultados obtidos durante a pesquisa inicial. Existe por esse motivo uma necessidade na técnica da transformação de monocotiledôneas para a produção de plantas transgênicas rapidamente para prover mais tempo e flexibilidade para tomar decisões com relação à pesquisa e ao desenvolvimento do produto durante uma janela de desenvolvimento de prioridade. Esse sistema de alta produção para transformação do milho pode produzir um grande número de plantas transgênicas para o teste de genes e criação de plantas úteis e ao mesmo tempo abaixa o custo de material e de mão-de-obra.

Além disso, as respostas da cultura embriogênica de diferentes linhas de geração diferem grandemente, limitando os genótipos de culturas tais como a do milho que podem ser transformadas. Por consequência, algumas linhas podem formar callus embriogênicos com rapidez, embora muitas, em geral, falhem na formação de qualquer callus embriogênico. Essas linhas são quase sempre consideradas linhas "recalcitrantes". Isso pode exigir o uso de linhas não de elite para a transformação, o que pode necessitar de muitas gerações de geração para a produção de variedades transgênicas de elite agrônômica. Dessa forma também existe uma necessidade adicional de métodos de transformação que permitam a transformação de genótipos de milho até agora "recalcitrantes" para permitir uma escolha mais ampla de

linhas transformáveis para o desenvolvimento do produto, bem como para a varredura de tais genótipos com relação ao potencial de capacidade de transformação dos mesmos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 Em um aspecto, a invenção proporciona um método para a produção de uma planta monocotiledônea transgênica que compreende: (a) transformar uma ex-planta com pelo menos um primeiro DNA selecionado; (b) cultivar a ex-planta em um primeiro meio de cultura que compreende uma proporção efetiva de citoquinina e auxina com a finalidade de promover o desenvolvimento de estruturas regeneráveis capazes da formação de raiz e/ou de broto; e (c) cultivar a ex-planta em pelo menos um segundo e/ou terceiro meio de cultura que sustente o crescimento simultâneo de tecidos de raiz e de broto, para a produção de uma planta monocotiledônea transgênica regenerada; em que a planta monocotiledônea transgênica regenerada é produzida dentro de 4 a 8 semanas da transformação da ex-planta. O método pode também compreender, em uma modalidade, a transferência da planta monocotiledônea transgênica regenerada para um meio de crescimento de plantas. Em modalidades específicas, o meio de crescimento é uma matriz não estéril, incluindo uma matriz não estéril existente em um bujão.

 Em determinadas modalidades, as estruturas regeneráveis são formadas dentro de cerca de 6 a 14 dias da transformação da ex-planta. Em outras modalidades, a etapa (b) é completa dentro de cerca de 6 a 14 dias da transformação da ex-planta. Em outra modalidade, a etapa (b) é executada durante um período de cerca de 6 até 12 dias. Em ainda outras modalidades, as etapas (a) e (b) são executadas sem a proliferação de um callus durante mais do que cerca de 10 dias até cerca de duas semanas em seguida da transformação da ex-planta. Em determinadas modalidades, o primeiro meio de cultura compreende um composto bactericida, tal como a carbenicilina ou outro composto que iniba o crescimento de rizóbio, incluindo a *Agrobacterium*, usada para a transformação da ex-planta. Em outras modalidades, o segundo e/ou o terceiro meio de cultura compreendem sacarose,

em uma concentração mais alta do que a encontrada no primeiro meio de cultura. Em modalidades específicas, o primeiro meio de cultura compreende Lynx 1947.

Em outras modalidades, a etapa (c) compreende cultivar a ex-planta em um meio de cultura líquido isento da adição de regulador do crescimento de planta que sustente o crescimento simultâneo de tecidos de raiz e de broto, para a produção de uma planta transgênica monocotiledônea regenerada. Em modalidades específicas, o meio de cultura que sustenta o crescimento simultâneo de tecidos de raiz e de broto, compreende o Lynx 2067. Em outras modalidades, a etapa (c) se inicia com cerca de 4 a 8 semanas a partir da transformação da ex-planta.

Em determinadas modalidades, a proporção de citoquinina para auxina no primeiro meio de cultura é a partir de cerca de 0,005 até cerca de 0,03 (p/p). Em outras modalidades, a proporção de citoquinina para auxina no primeiro meio de cultura é a partir de cerca de 0,005 até cerca de 0,03 em uma base molar. Em modalidades específicas, a citoquinina pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em BAP, zeatina, quinolina e TDZ; e a auxina pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em IAA, 2,4-D, NAA, IBA e dicamba. Em outras modalidades, a citoquinina e/ou a auxina no primeiro meio de cultura podem compreender um efeito regulador do crescimento de planta equivalente às quantidades e proporções das citoquininas ou das auxinas acima relacionadas.

Em ainda outra modalidade, a etapa (c) também compreende o cultivo da ex-planta em um segundo meio de cultura que compreende uma proporção aumentada de um regulador do crescimento de formação de brotos para a auxina com relação ao primeiro meio para promover o desenvolvimento de raiz(es) e de broto(s) simultaneamente. Em modalidades específicas, o meio da etapa (c) é o Lynx 2068 e/ou o Lynx 2202.

Determinadas modalidades dos métodos da presente invenção podem ainda compreender a cultura de uma ex-planta em um segundo e/ou terceiro meios de cultura que não tenham os reguladores de crescimento de plantas. Em algumas modalidades, a proporção de regulador do crescimento

de formação de brotos para a auxina no segundo meio e a partir de cerca de 0,02 até cerca de 0,06 (p/p). Em modalidades específicas, o segundo meio é o Lynx 2202 ou o Lynx 2068. Em determinadas modalidades, o meio de crescimento fresco não é adicionado em seguida ao início da etapa (c).

5 Em ainda outras modalidades, o primeiro meio de cultura compreende cerca de 0,001 mg/l até cerca de 10 mg/l de citoquinina e cerca de 0,1 mg até cerca de 15 mg/l de auxina, por exemplo, cerca de 0,005 mg/l de citoquinina até cerca de 0,05 mg/l de citoquinina e cerca de 0,1 mg/l de auxina, até cerca de 0,5 mg/l de auxina. Em ainda outras modalidades, a ex-
10 planta é também cultivada em um quarto meio entre a cultura nos primeiro e no segundo meios, em que o quarto meio compreende uma quantidade efetiva de auxina e de citoquinina para a promoção a proliferação de callus. Em modalidades específicas, o quarto meio é o Lynx 2063.

 Em outras modalidades, a ex-planta é também cultivada em um
15 quinto meio entre a cultura nos segundo e terceiro meios, em que o quinto meio compreende uma quantidade de citoquinina efetiva para a promoção do crescimento de brotos.

 Em modalidades específicas, o quinto meio é o Lynx 2066.

 Em determinadas modalidades, a transformação da ex-planta
20 compreende a transformação mediada por bactérias. Em modalidades específicas, a transformação mediada por bactérias é realizada com a utilização de uma bactéria selecionada a partir do grupo que consiste em *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., e *Bradyrhizobium* sp.

25 Em outras modalidades, o segundo e/ou o terceiro meios de cultura compreendem uma quantidade de auxina que é reduzida com relação à quantidade no primeiro meio, citoquinina, ácido abscísico, ou uma combinação. Em uma modalidade específica, o segundo e/ou o terceiro meios de cultura compreendem menos do que a metade da atividade tanto de auxina
30 como do regulador do crescimento de planta do tipo da auxina como o primeiro meio.

 Em determinadas modalidades, o primeiro meio de cultura e

meio de cultura que sustenta o crescimento simultâneo dos tecidos de raiz e de broto são meios líquidos. Em outras modalidades, o primeiro meio de cultura é um meio de cultura semissólido. Em modalidades específicas, cada meio que é usado em seguida ao primeiro meio de cultura é um meio líquido.

- 5 Em determinadas modalidades, as etapas (b) e (c) são executadas em um único recipiente.

Em determinadas modalidades, a planta monocotiledônea é uma planta de milho, arroz, sorgo, trigo, centeio, milho pequeno, cana-de-açúcar, aveia, triticale, "switchgrass" ou grama de turfa. Em uma modalidade específica, a planta monocotiledônea é a planta de milho.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um sistema para a expansão de uma janela de desenvolvimento de prioridade para a produção de plantas transgênicas que compreende: (a) selecionar um segmento de DNA candidato de interesse para a produção de uma planta transgênica com base pelo menos em parte em dados coletados em um primeiro teste de campo; (b) preparar uma planta monocotiledônea transgênica que compreenda o segmento de DNA candidato através do método da reivindicação 1; e (c) avaliar a planta transgênica com relação ao fenótipo desejado e/ou genótipo em pelo menos um segundo teste de campo realizado em uma estação de cultivo em seguida aquela na qual o primeiro teste de campo é realizado. Em modalidades específicas, um ou ambos o primeiro teste de campo ou o segundo teste de campo são realizados no meio oeste dos Estados Unidos. Em determinadas modalidades, a avaliação da planta transgênica compreende a medição do desempenho agrônômico. Em modalidades específicas, o segundo teste de campo é um teste de resultado híbrido. Em ainda outras modalidades, o segundo teste de campo é realizado em duas estações de cultivo depois do primeiro teste de campo.

Um outro aspecto da presente invenção proporciona um método para a varredura de células de uma linha de planta de lavoura com relação à capacidade de transformação, que compreende (a) cultivar ex-plantas de uma planta de lavoura em um meio de crescimento que sustente a produção de primórdios do broto dentro de cerca de 1 a 2 semanas; (b) cultivar o pri-

mórdio do broto sob condições que sustente o alongamento do broto durante pelo menos cerca de uma semana adicional no escuro para ser obtido um tecido do broto em crescimento e/ou brotos; e (c) cultivar o tecido ou os brotos da etapa (b) em um meio de crescimento de plantas durante pelo menos

5 cerca de uma semana adicional para serem obtidos botões de broto e/ou plantas; em que a capacidade de transformação das células é medida através da capacidade do primórdio do broto para a produção de botões de broto e/ou plantas em seguida a etapa (c).

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10 Figura 1. Diagrama de linha do método de controle de transformação ("BPD") e duas modalidades ilustrativas da presente invenção mostrando o número de etapas de cultura e de transferência de tecido e etapas de transferência/mudança de meio. Um bloco pequeno representa cerca de uma semana de duração. As setas escuras representam a transferência física de ex-plantas para um novo recipiente. As setas com padrão representam a aspiração e a troca de meio. As setas com faixas representam a adição de

15 meio sem aspiração.

 Figura 2. A presença de citoquinina durante o primeiro meio permite uma transformação eficiente e rápida por facilitar a produção dos primórdios do broto. As ex-plantas foram analisadas de modo histoquímico com

20 relação à expressão de *gus* 10 dias depois da transformação e exibiram setores transgênicos grandes (TS) e primórdio de broto (SP).

 Figura 3. Plantas de milho transgênico de quatro (A), seis (B) e sete (C) semanas de idade produzidas através do método da presente invenção.

25

 Figura 4. Diagrama em linha mostrando a redução adicional do número de etapas de cultura, etapas de transferência de tecido e etapas de transferência/troca de meio. Um bloco pequeno representa cerca de uma semana de duração. As setas escuras representam a transferência física de

30 ex-plantas para um novo recipiente. As setas com padrão representam a aspiração e a troca de meio, As setas com faixas representam a adição de meio sem aspiração.

Figura 5. Impacto do protocolo de Cultura Líquida Rápida (RLC) sobre a iniciação da transformação durante a "janela de prioridade de desenvolvimento".

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- 5 A invenção proporciona métodos aperfeiçoados de transformação que reduzem substancialmente o tempo necessário para a produção de plantas transgênicas e expande a faixa de genótipos que podem ser transformados. Em uma modalidade, o uso de meio líquido combinado com procedimentos eficientes de manipulação de plantas e etapas de meio e de cultura
- 10 simplificados oferece vantagens tais como tempo de produção mais curto, resultado de produção mais alto, baixa em custos de material e de mão-de-obra, e vantagens de segurança ergonômica, mantendo ao mesmo tempo a frequência de transformação (TF) em um nível útil, ou mesmo aumentando a TF.
- 15 Além disso, por permitir a produção de plantas de milho transformadas através de tais métodos rápidos, é agora possível usar de forma mais eficiente uma janela de prioridade de desenvolvimento afetada pela estação, isto é, com relação à tomada de decisões com relação à transformação de construtos e eventos em vista das estações de plantação em diversas localizações, bem como com base nos resultados de testes de campo
- 20 realizados dentro dessas localizações. Essas localizações incluem, por exemplo, o United States Corn Belt, incluindo todo ou a maioria dos estados de Iowa, Indiana, Illinois, e Ohio, e partes de South Dakota, Nebraska, Kansas, Minnesota, Wisconsin, Michigan, Missouri, e Kentucky. Isso reduz as
- 25 barreiras para o planejamento e a prioridade dos estudos de construto de genes e de eventos de transformação de plantas. Dessa forma, reduzir um protocolo de transformação de milho de 10 a 12 semanas para 6 a 7 semanas ou menos expande de forma efetiva o desenvolvimento do produto em de 5 a 6 semanas, permitindo até duas vezes a capacidade de transformação
- 30 em uma estrutura de tempo de tal forma que resulte em testes de transformantes adicionais iniciados durante a janela de desenvolvimento de prioridade seja possível na segunda estação de crescimento em seguida a ocor-

rência do evento de transformação.

Em determinados aspectos, os inventores descobriram que o uso de meio líquido com uma matriz em várias etapas no lugar do meio semilíquido comumente usado pode resultar em um TF mais baixo. No entanto, o uso de meio de seleção e de regeneração líquido com um meio de retardamento que contenha citoquinina resulta em um TF similar como com o meio de seleção e de regeneração semissólido. Por esse motivo, um método mais rápido foi desenvolvido através da combinação de etapas de retardo e de cocultura anteriormente separadas através do uso de um meio e ao mesmo tempo mantendo/melhorando o TF. A presença da citoquinina no meio de cocultura e de retardo (o primeiro meio) aciona uma resposta de regeneração precoce e reduz ao mesmo tempo a formação de callus ou a formação de callus simultânea e a regeneração da planta, levando dessa forma a uma regeneração mais rápida. A presença de carbenicilina, um composto bactericida no meio de cocultura permite que as ex-plantas sejam cultivadas no mesmo meio durante um período de tempo prolongado, isto é de 7 a 14 dias depois do suprimento do DNA através da transformação mediada pela *Agrobacterium*. Além disso, a(s) etapa(s) tradicionalmente separada(s) da proliferação do callus e seleção pode(m) ser eliminada(s), enquanto ainda alcançando um TF aceitável, na medida em que as ex-plantas podem ser transferidas diretamente para um segundo e/ou um terceiro meio que promova o crescimento e o desenvolvimento dos primórdios dos botões de broto. Desse modo, os genótipos importantes, anteriormente "recalcitrantes", que exibiram uma resposta embriogênica e capacidade de transformação limitada através de uma abordagem com base no callus podem agora serem usados diretamente com o alvos da transformação, e sem outra manipulação física do material da ex-planta, isto é, a subcultura com a transferência manual para meios diferentes, através do uso do regime de cultura como o descrito aqui, neste pedido de patente.

Os métodos de transformação descritos aqui proporcionam uma melhoria significativa som relação ao método de transformação corrente conhecido na técnica. Através da utilização de tais métodos, foi descoberto de

forma surpreendente que uma planta transformada pode ser produzida dentro de 4 a 6 semanas depois do contato das células com um agente de transformação que está pronto para o transplante dentro de uma matriz de crescimento tal como uma bucha e/ou solo e é produzido através de procedimentos mais eficientes em com uma faixa mais ampla de genótipos. Em alguns aspectos, o método também emprega meio líquido com uma matriz de suporte adequada. O uso da cultura líquida reduz o número de etapas de transferência de seis para tão pouco como duas ou três. Ainda mais, as etapas de seleção de uma célula transformada e de regeneração podem ser conseguidas em um único recipiente até que as plantas sejam transferidas para o solo. Os métodos são dessa forma adequados para um sistema de produção automatizado de alto rendimento.

Determinados genótipos de monocotiledôneas respondem de forma insuficiente às condições de cultura embriogênicas. Isto é, os embriões, ou os callus embriogênicos que levam à regeneração eficiente, não são produzidos sob essas condições. Esses genótipos "recalcitrantes" possuem frequências de transformação em zero ou próximas a zero quando são tentados os métodos previamente descritos. Desse modo, os métodos correntes que podem ser usados para a transformação de uma ampla variedade de genótipos, especialmente as linhas recalcitrantes, proporcionam uma escolha mais ampla de linhas que possam ser transformadas e representam um avanço significativo na técnica.

Além disso, métodos para avaliar a capacidade de transformação de células de uma linha de plantas de lavoura monocotiledôneas têm sido tipicamente focalizados em medir a capacidade de uma determinada linha para a produção de callus embriogênicos sob as condições certas. Essas abordagens convencionais para a varredura da formação do callus embriogênico utiliza embriões imaturos que são isolados e cultivados em meio de cultura de tecido capazes de sustentar a formação do callus embriogênico. Tão importante quanto a capacidade de transformação é a capacidade de uma linha de células sustentar esse crescimento do callus embriogênico com o passar do tempo, uma vez que algumas linhas de células exibem uma

explosão reduzida da formação de callus, porém não mantêm em seguida o potencial embriogênico dos mesmos.

Assim, uma modalidade da presente invenção compreende um novo método para a varredura de células de plantas de lavoura com relação à capacidade de transformação. Este método, em um aspecto, compreende o cultivo de ex-plantas (como, por exemplo, embriões imaturos de milho) em um meio capaz de produzir primórdios de brotos em um tempo curto (como por exemplo, dentro de 1 a 2 semanas, por exemplo dentro de 1 semana). Os tecidos são em seguida transferidos para meio de regeneração/alongamento durante cerca de 2 a 3 semanas sob condições de escuridão, antes de serem colocados em um meio de crescimento durante cerca de 2 a 3 semanas adicionais. A capacidade das linhas para regenerar os botões de brotos e/ou as plantas sob essas condições indica a competência de transformação das mesmas através dos métodos da presente invenção incluindo aqueles nos quais não é provida uma fase de crescimento de callus, ou no qual um período de crescimento de callus é reduzido de forma substancial a partir de métodos anteriores de regeneração de culturas de células.

Um método da invenção em uma modalidade também inclui expor uma ex-planta transformável a um agente de transformação. As ex-plantas adequadas incluem as partes de plantas transformáveis tais como callus, células e embriões. Em modalidades específicas, a ex-planta pode ser um embrião imaturo de cerca de 2,0 a 3,0 mm de comprimento, por exemplo, o tamanho do embrião pode ficar entre cerca de 1,6 a 2,6 mm de comprimento, cerca de 8 a 14 dias após a polinação (DAP), incluindo um tamanho de embrião de cerca de 2,0 mm em cerca de 10 a 12 dias após a polinação. As etapas de desenvolvimento e a morfologia do embrião de milho já foram descritas (como por exemplo, em Matthys-Rochon *et al.*, 1998, e as referências contidas no mesmo). Os agentes de transformação adequados incluem as bactérias de transformação de plantas que contenham um construto de DNA para serem transferidas. Os exemplos de tais bactérias incluem *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobi-*

um sp., e *Bradyrhizobium* sp. (como por exemplo, Broothaerts *et al.*, 2005; Pedido de Patente U.S. 11/749.583). A ex-planta também pode ser exposta ao construto de DNA através da reabsorção direta, microinjeção, eletroporação e bombardeamento com microprojéteis, ou por qualquer outro método conhecido daquelas pessoas versadas na técnica.

Tipicamente, um construto de DNA inclui uma ou mais unidades de expressão. Essas unidades de expressão compreendem em geral na direção de 5' para 3': um promotor, ácido nucléico codificando para uma característica útil ou para a supressão de gene, uma região 3' não traduzida. Diversos outros elementos de expressão tais como as UTR 5', sequências de peptídio de transito organelar e íntrons (especialmente para as monocotiledôneas) são usualmente adicionados para facilitar a expressão da característica. Outros componentes genéticos que servem para aumentar a expressão ou afetar a transcrição ou translação de um gene em uma planta também são considerados para uso.

Numerosos promotores de plantas são conhecidos daquelas pessoas versadas na técnica. Esses promotores incluem porém não estão limitados ao promotor nopalina sintase (NOS), promotores 19S e 35S de vírus do mosaico da couve flor (CaMV) (por exemplo, ver a Patente U.S. 5.352.605), o promotor CaMV 23S melhorado, um promotor ssRUBISCO e um promotor de actina (como por exemplo, o promotor de actina do arroz, ver a Patente U.S. 5.641.876) entre outros. O construto de DNA pode incluir uma segunda unidade de expressão na qual o ácido nucléico codifique uma proteína de marcação para a seleção, varredura ou classificação de uma célula transformada.

Para a prática da presente invenção, as composições e métodos para preparar e usar os construtos e células hospedeiras são bem conhecidos daquelas pessoas versadas na técnica, ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, (2000). Os métodos para fazer construtos de transformação adequados de forma específica para a transformação de plantas incluem sem limitação aqueles descritos nas Patentes U.S. Nos. 4.971.908, 4.940.835, 4.769.061 e 4.757.011, todas as quais são incorporadas a este pedido de

patente por referência em suas totalidades.

Normalmente, as unidades de expressão são providas entre uma ou mais margens de T-DNA em um construto de transformação. Os construtos de transformação permitem a integração da unidade de expressão entre as margens do T-DNA dentro do genoma de uma célula de planta. Os construtos também podem conter a estrutura principal do plasmídio dos segmentos de DNA que proporciona a função de replicação e a seleção antibiótica em células bacterianas, por exemplo, uma origem de replicação de *Escherichia coli* tal como ori 322, uma faixa ampla de origem de hospedeiros de replicação tal como ori V ou ori Ri, e uma região de codificação para um marcador selecionável tal como Spec/Strp que codifique para o aminoglicosídeo adeniltransferase Tn7 (aadA), conferindo resistência à espectomicina ou à estreptomicina, ou a um gene marcador selecionável de gentamicina (Gm, Gent). Para a transformação de plantas, a cepa bacteriana hospedeira é quase sempre a *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, LBA4404, EHA101, ou EHA105 que contém o plasmídio que tem uma função de transferência para a unidade de expressão. Outras cepas conhecidas daquelas pessoas versadas na técnica da transformação de plantas podem funcionar na presente invenção.

Depois do contato de uma ex-planta com um agente de transformação, a ex-planta pode ser cultivada em um primeiro meio (como por exemplo, Lynx #1947) que combine os atributos de uma cocultura e um meio de retardo devido à presença de um composto bactericida tal como a Carbenicilina. Esse meio compreende uma citoquinina e uma auxina. Pelo provimento de uma quantidade efetiva de reguladores do crescimento de planta e a proporção apropriada de citoquinina para a auxina ou quaisquer outros reguladores de crescimento que sejam conhecidos como afetando a formação de callus e/ou brotos, esse meio permite a regeneração subsequente de tecidos, incluindo os tecidos transformados, para iniciar sem a necessidade de uma fase separada de proliferação de callus ou uma resposta embriogênica sustentada. As concentrações efetivas do(s) regulador(es) de crescimento e/ou a proporção de citoquinina para a auxina podem variar

de genótipo para genótipo, e o tipo de espécie de planta usado. Em seguida ao primeiro meio, em determinadas modalidades, a ex-planta pode ser cultivada em um meio isento de regulador de crescimento para promover a regeneração da planta. Em determinadas modalidades, este meio é um meio líquido.

Os métodos providos pela invenção podem ser executados com a utilização de genótipos que sejam capazes de produzir uma resposta clássica de callus embriogênico, bem como para genótipos recalcitrantes que falham em exibir uma quantidade apreciável de resposta de cultura embriogênica, ou resposta de cultura prolongada com outros métodos de cultura anteriormente conhecidos. O período de cultura no primeiro meio pode ser variado dependendo da necessidade com relação a um TF específico. Em uma modalidade, o período de cultura no primeiro meio é a partir de cerca de 6 ou 7 até cerca de 10 a 14 dias. A regeneração precoce também reduz o número de plantas clonais (isto é, irmãs), incluindo as plantas não transformadas, que tendem a aparecer em seguida à formação de callus e que podem tornar a varredura a jusante menos eficiente. A citoquinina pode ser adicionada ao meio de inoculação ou de cocultura. De forma alternativa, a citoquinina pode ser produzida através de um gene de síntese da citoquinina tal como um gene para a isopentenil transferase (por exemplo, a Patente U.S. 6.294.714) dentro da ex-planta de uma linha transformada.

Os exemplos das diversas citoquininas que são adequadas para serem usadas tanto de forma isolada como em combinação com o presente método incluem 6-benzil aminopurina (BAP), quinetina, zeatina, fosfato de adenosina, tidiazuron (TDZ) e outros compostos do tipo da citoquinina. Os exemplos das diversas auxinas que são adequadas para serem utilizadas tanto de forma isolada como em combinação com o presente método incluem IAA, 2,4-D, NAA, IBA, dicamba, e outros compostos do tipo da auxina. Uma pessoa versada na técnica de cultura e transformação de células de plantas é capaz de determinar os níveis apropriados de reguladores de crescimento de plantas de formação de broto e auxinas, e as proporções apropriadas dos dois, que sejam adequadas para serem usadas com a presente

invenção. Por exemplo, os níveis desses ou de outros reguladores do crescimento de plantas com um nível de atividade equivalente como, por exemplo, o BAP e/ou 2,4 D em planta de milho ou em outra planta de lavoura, pode ser determinado através da variação dos níveis de tais reguladores de crescimento presentes no meio de crescimento ao mesmo tempo em que as ex-plantas são cultivadas no meio, e em seguida ao crescimento das ex-plantas e dos tecidos derivados a partir das mesmas. Desse modo, se forem usados outros reguladores de crescimento, ele poderiam todavia compreender um efeito regulatório de crescimento de planta equivalente aquelas quantidades e proporções contempladas das citoquininas e das auxinas acima relacionadas.

Uma ex-planta desdiferenciada que compreenda pelo menos um primórdio de broto pode ser produzida depois da cocultura/retardo no primeiro meio e pode ser cultivada em um segundo meio que inclua uma proporção aumentada de um regulador do crescimento de formação de broto, tal como uma citoquinina ou ABA, para a auxina maior do que no primeiro meio. Alternativamente, o segundo e/ou o terceiro meio podem compreender uma quantidade reduzida de auxina do que o primeiro meio, e podem ainda compreender uma quantidade efetiva de sacarose mais alta do que a do primeiro meio para a redução da proliferação de callus e uma regeneração mais rápida. Por exemplo, 50 g/l de sacarose no segundo meio e 60 g/l no terceiro meio podem ser utilizados. Em outra alternativa, o segundo meio e/ou o terceiro meio podem compreender somente uma quantidade efetiva de um regulador do crescimento da formação de broto tal como uma citoquinina e/ou ABA sem a atividade adicionada da auxina ou do tipo da auxina. Em seguida, a ex-planta pode ser cultivada em um terceiro meio de cultura compreendendo pouco ou nenhum reguladores de crescimento de planta para o alongamento do broto e a produção de raiz.

Em uma modalidade, o método combina o meio de cocultura e de retardo tradicional em um primeiro meio reduzindo dessa forma o número de meios necessários para a transformação e a subsequente cultura, de cinco para quatro. Em outra modalidade, o método elimina o meio de prolifera-

ção de callus/seleção, dois meios de regeneração, um meio de formação de raiz e proporciona um meio modificado de regeneração e alongamento que pode não ter as quantidades apreciáveis de regulador de crescimento de planta adicionadas, reduzindo por esse motivo o número de meios requeridos para a transformação, de seis para três. Em ainda outra modalidade, o método usa somente o primeiro meio e o terceiro meio reduzindo por essa razão o número de meios requeridos para a transformação, de seis para dois.

Em outras modalidades, o primeiro meio é um meio semissólido e os outros meio são meios líquidos. Em ainda outra modalidade, todos os meios são meios líquidos. No entanto, se tornará aparente para aquelas pessoas versadas na técnica, o uso de uma combinação de meios semissólidos e líquidos e usar somente uma ou mais das modificações providas aqui dependendo da necessidade.

Em uma modalidade específica, a ex-planta é cultivada no primeiro meio de cultura, tal como o Lynx #1947, durante cerca de 7 a 14 dias, no segundo meio de cultura tal como o Lynx # 2202, durante cerca de 7 dias, e no terceiro meio de cultura tal como o Lynx # 2067 durante cerca de 14 a 28 dias. No entanto, o número de dias em um ou mais meios pode ser aumentado ou diminuído através da inspeção visual do crescimento da planta transgênica por aqueles versados na técnica. Em outra modalidade, a ex-planta é cultivada adicionalmente em um quarto meio entre o primeiro e o médio durante cerca de 14 dias e em um quinto meio de cultura durante cerca de 7 dias entre ele e o terceiro meio de cultura. O quarto meio, tal como o Lynx # 2063, pode conter reguladores do crescimento de plantas incluindo a auxina, citoquinina e AgNO_3 , e é formulado para suportar a proliferação de células. O quinto meio, tal como o Lynx # 2066, pode conter citoquinina, porém geralmente nenhuma auxina, e é formulado para sustentar o crescimento e o alongamento de brotos. Em determinadas modalidades, os segundo, terceiro, quarto e/ou quinto meios adicionados podem não conter nenhuma quantidade de um regulador do crescimento de plantas, embora promovendo o desenvolvimento de plantas regeneradas. O segundo ou outros meios

subsequentes podem ser meios líquidos, semissólidos ou sólidos. Em modalidades específicas, somente dois meios podem ser empregados, isto é, um meio de cocultura/retardo tal como, por exemplo o Lynx 1947, e um meio subsequente, por exemplo os derivados do Lynx 2067 e Lynx 2066 (também descritos como o "terceiro" e "quinto meio" respectivamente) aos quais faltam quantidades apreciáveis de auxina, em um método para a obtenção de plantas regeneradas transformadas dentro de 4 a 8 semanas de transformação (para as composições dos meios ver, por exemplo, as Tabelas 2, 3).

O número de dias em um ou mais meios pode ser aumentado ou diminuído através de inspeção visual das ex-plantas por aquelas pessoas versadas na técnica. A invenção desse modo proporciona uma planta regenerada, e partes da mesma, que seja capaz de crescer em um meio com base em solo ou em qualquer outra matriz não estéril dentro de 4 a 6 semanas depois de que a ex-planta da qual ela é derivada foi posta em contato com um agente de transformação, tal como pela transformação de uma ex-planta com um DNA selecionado. Em uma modalidade específica, plantas regeneradas de 4 a 8 semanas são transplantadas para dentro de buchas (Q Plugs by International Horticultural Technologies, Hollister, CA), para crescimento e desenvolvimento adicional e varredura inicial, por exemplo para a determinação do genótipo e/ou o fenótipo das mesmas com relação a um transgene de interesse.

Em outras modalidades, os segundo, terceiro, quarto e/ou quinto meios também incluem um agente de seleção tal como o herbicida glifosato para a terminação ou pelo menos o retardamento do crescimento da maioria das células, tecido ou órgão no qual o construto de DNA não tenha sido suprido. Outros agentes de seleção adequados que podem ser usados de forma isolada ou em combinação incluem porém não estão limitados a herbicidas do tipo da auxina, tais como o dicamba ou 2,4-D, MCPA, 2,4-DB, glufosinato, inibidores do acetolactato sintase, inibidores da protoporfirinogênio oxidase, e inibidores da hidroxifenil-piruvato-dioxigenase, neomicina, kanamicina, paramomicina, G418, aminoglicosídeos, espectinomicina, estreptomomicina, higromicina B, bleomicina, fleomicina, sulfonamidas, estreptotricina,

cloranfenicol, metotrexato, 2-deoxiglicose, aldeído de betaina, S-aminoetil L-cisteína, 4-metiltryptofano, D-xilose, D-manose, benziladenina-N-3-glucuronidase. Os exemplos de genes que proporcionam tolerância a esses agentes de seleção estão descritos em Miki e McHugh, (2004).

5 É conhecida uma variedade de meios de cultura de tecidos de planta que, quando suplementados de modo apropriado, sustentam o crescimento e o desenvolvimento do tecido de plantas. Esses meios de cultura de tecido podem tanto ser comprados como uma preparação comercial ou
10 preparados por encomenda e modificados pelas pessoas versadas na técnica. Os reagentes estão comercialmente disponíveis e podem ser comprados de uma quantidade de fornecedores (ver, por exemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; e PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS). Os exemplos desses meios incluem porém não estão limitados àqueles descritos por Murashige e Skoog (1962); Chu *et al.* (1975); Linsmaier e Skoog
15 (1965); Uchimiya e Murashige (1962); Gamborg *et al.* (1968); Duncan *et al.* (1985); McCown e Lloyd (1981); Nitsch e Nitsch (1969); e Schenk e Hildebrandt (1972), ou derivações desses meios suplementadas de forma apropriada. Aquelas pessoas versadas na técnica estão cientes que os meios e os suplementos dos meios tais como os nutrientes e reguladores de crescimento
20 para uso na transformação e na regeneração são usualmente otimizados para a lavoura-alvo específica ou a variedade de interesse. Também podem ser selecionados vários componentes tais como sais basais, vitaminas, fonte de carbono a partir de um ou de outro meio para ser obtido o crescimento e o desenvolvimento desejado. Os meios de crescimento de
25 plantas usados em um método anterior (como por exemplo, Cai *et al.*; Publicação do Pedido de Patente U.S. 20040244075, e incorporado aqui por referência) estão mostrados na Tabela 1. As composições de meios de preferência usados no método presente estão relacionadas nas Tabelas 2 e 3. As diferenças entre as receitas usadas na presente invenção e as receitas-padrão usadas nos métodos convencionais de transformação de monocotiledôneas são, por exemplo, que aqueles métodos convencionais usam meios
30 que permitem a proliferação e a seleção de callus, seguida pela regene-

ração e o crescimento do evento transgênico. Em contraste, os meios da presente invenção permitem tão somente a formação do callus para a formação do primórdio do broto evitando por meio disso a formação de plantas quiméricas e permitindo a seleção eficiente através da formação simultânea do callus e a regeneração da planta, em uma maneira que permita uma transformação em alta frequência.

Em geral, um primeiro meio pode funcionar como um meio de cocultura e de retardo, e compreende reguladores do crescimento de plantas tais como uma auxina (como por exemplo, 2,4 D), uma citoquinina (como por exemplo, BAP), e nitrato de prata, bem como acetosiringona para facilitar a transformação mediada pela *Agrobacterium*. O primeiro meio também pode conter um composto bactericida tal como a carbenicilina que permite que as ex-plantas sejam cultivadas no mesmo meio durante um período de tempo prolongado, isto é de 7 a 14 dias, depois do contato da ex-planta com o agente de transformação. Um segundo meio (por exemplo, o 2202) também pode compreender esses reguladores do crescimento de planta, porém a auxina é reduzida. De forma importante, este segundo meio pode funcionar como um meio de regeneração. Um terceiro meio (por exemplo, o 2067) não tem reguladores de crescimento e funciona como um meio de regeneração e de alongamento do broto. Um quarto meio (por exemplo, o 2063) compreende uma quantidade similar de reguladores de crescimento como o primeiro meio, e pode funcionar para sustentar a proliferação do callus. Um nível baixo de um agente de seleção também pode estar presente, para favorecer o crescimento do tecido transformado. Um quinto meio (como por exemplo, o 2066) não contém auxina e nitrato de prata, e tem um nível baixo de citoquinina e sustenta a regeneração. De forma alternativa, os meios adicionados em seguida ao primeiro meio podem não conter quantidades efetivas de um regulador de crescimento de planta, e ao mesmo tempo sustentando o desenvolvimento e o crescimento de uma planta regenerada. Em uma modalidade específica, um segundo meio diferente sem auxina porém com alguma citoquinina (como por exemplo, 2347, 2348, 2415, 2414; ver a Tabela 3) também pode ser empregado como o meio de regeneração que pode sus-

tentar a regeneração e o alongamento no lugar do segundo meio inicialmente descrito (isto é, o 2202). Os meios 2348, 2415, 2414 são essencialmente o mesmo como o 2066 porém com nitrato de prata, e contem quantidades diferentes de glifosato. O meio 2347 é essencialmente o mesmo como o 5 2067, porém com nitrato de prata e uma citoquinina. As modificações de tais meios podem ser feitas por uma pessoa versada na técnica da transformação de células de planta e de cultura de tecido, dependendo da espécie e do genótipo do tecido da ex-planta em questão, mantendo ao mesmo tempo os atributos da cultura de célula descritos.

Tabela 1. Composições de meios usados em um método anterior (Cai et al.; Publicação do Pedido de Patente U.S. 2004/00244075).

Componentes do meio/ (fornecedores)	1233 (cocultura)	1278 (MSW 50+BAP), (seleção)	1073 (MSI6BA) (1ª regeneração)	1071 (MSOD) (2ª regeneração)	1084 (formação de raiz)
MS Sais basais (Phyto- tech)	2,165 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	2,165 g
MS Vitaminas (100X) (Phytotech)	10 mL	10 mL	0	0	0
MS Fromm Vitaminas (1000X)*	0	0	1 mL	1 mL	0
BAP (Sigma)	0	0,01 mg	3,5 mg	0	0
Tiamina HCL (Sigma)	0,5 mg	0,5 mg	0	0	0
2,4-D (Phytotech)	3 mg	0,5 mg	0	0	0
NAA (Sigma)	0	0	0	0	0,5 mg
IBA (Sigma)	0	0	0	0	0,75 mg
Sacarose (Phytotech)	20 g	30 g	30 g	0	20 g
Glicose (Phytotech)	10 g	0	0	10 g	0
Maltose (Phytotech)	0	0	0	20 g	0
Prolina (Sigma)	115 mg	1,38 g	1,38 g	0	0
Ácidos casamino (Difco)	0	0,5 g	0,05 g	0,5	0
Mono-hidrato de Aspa- ragina (Sigma)	0	0	0	0,15	0
Mio-inositol (Sigma)	0	0	0	0,1 g	0

Continuação

Componentes do meio/l (fornecedores)	1233 (cocultura)	1278 (MSW 50+BAP), (seleção)	1073 (MS/6BA) (1ª regeneração)	1071 (MSOD) (2ª regeneração)	1084 (formação de raiz)
Agarose de baixo EEO (Sigma)	5,5 g	0	0	0	0
Phytigel (Sigma)	0	3 g	3 g	3 g	3 g
Acetosiringona (Aldrich)	200 uM	0	0	0	0
Carbenicilina (Phytotech)	500 mg	500 mg	250 mg	250 mg	0
Glifosato (Gateway Chemical)	0	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
Nitrato de prata (Sigma)	3,4 mg	3,4 mg	0	0	0
pH	5,2	5,8	5,8	5,8	5,8

* Compreendendo 1250 mg/l de ácido nicotínico (Sigma), 250 mg/l de piridoxina HCl (Sigma), 250 mg/l tiamina HCl (Sigma), e 250 mg/l de pantotenato de cálcio (Sigma).

Tabela 2: Composição de meios usados em diversos aspectos da presente invenção.

Componentes dos meios/I (fornecedores)	1898	2232	2233	1947 (1°)	2063 (4°)	2202 (2°)	2066 (5°)	2067 (3°)	2068
MS Sais basais (Phytotech)	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g
MS Vitaminas (100X) (Phytotech)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Tiamina HCl (Sigma)	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	0	0,5 mg
2,4-D (Phytotech)	0,5 mg	0,2 mg	0,2 mg	0,5 mg	0,5 mg	0,2 mg	0	0	0,2 mg
Sacarose (Phytotech)	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	50 g	50 g	60 g	50 g
Prolina (Sigma)	1,38 g	1,38 g	1,38 g	1,38 g	1,38 g	0	0	0	0
Casaminoácidos (Difco)	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0	0,5 g
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Agarose baixo EEO (Sigma)	5,5 g	5,5 g	5,5 g	5,5 g	0	0	0	0	0
Aditivos pós-autoclave				Aditivos pós-filtro de esterilização					
Carbenicilina (Phytotech)	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg
Acetosiringona (Aldrich)	200 uM	200 uM	200 uM	200 uM	0	0	0	0	0
BAP (Sigma)	0	0,01 mg	0	0,01 mg	0,01 mg	0,01 mg	0,01 mg	0	0,01 mg
Glifosato (Gateway Chemical)	0	0	0	0	0,2mM	0,2 mM	0,1 mM	0,02mM	0,2 mM

Continuação

Componentes dos meios/l (fornecedores)	1898	2232	2233	1947 (1°)	2063 (4°)	2202 (2°)	2066 (5°)	2067 (3°)	2068
Nitrato de prata (Sigma)	3,4 mg	3,4 mg	3,4 mg	3,4 mg	3,4 mg	3,4 mg	0	0	0

Tabela 3. Exemplos de outros tipos de 2º meio usados na presente invenção.

Componentes do meio/I (Fornecedores)	2347	2348	2414	2415
MS Sais basais (Phytotech)	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g
MS Vitaminas (100X) (Phytotech)	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Tiamina HCl (Sigma)	0	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg
Sacarose (Phytotech)	60 g	50 g	50 g	50 g
Ácidos Casamino (Difco)	0	0,5 g	0,5 g	0,5 g
pH	5,8	5,8	5,8	5,8
Aditivos pós-esterilização em filtro				
Carbenicilina (Phytotech)	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg
BAP (Sigma)	0,01 mg	0,01 mg	0,01 mg	0,01 mg
Glifosato (Gateway Chemical)	0,02mM	0,2mM	0,05mM	0,1 mM
Nitrato de prata (Sigma)	3,4 mg	3,4 mg	3,4 mg	3,4 mg

Para confirmar a presença do construto de DNA na planta regenerada, pode ser executada uma variedade de análises. Essas análises incluem, por exemplo, análises "biológicas moleculares" tais como Southern e northern blotting e PCR®; análises "bioquímicas", tais como para detectar a presença de um produto de proteína, como por exemplo, meios imunológicos (ELISA e western blots) ou através da função enzimática; análises de parte de plantas, tais como as análises de folha ou de raiz; e também, através da análise do fenótipo da planta total regenerada.

Uma vez que um gene tenha sido introduzido dentro de uma planta com a utilização do método presente, aquele gene pode ser introduzido dentro de qualquer outra planta compatível sexualmente com a primeira planta através de cruzamento, sem a necessidade de transformação direta da segunda planta. Por esse motivo, na forma usada aqui o termo "progênie" indica a descendência de qualquer geração de uma planta de origem, preparada de acordo com a presente invenção. Uma "planta transgênica" desse modo pode ser de qualquer geração.

A presente invenção também proporciona uma planta e partes de planta produzida através do método. De preferência, a planta é uma planta monocotiledônea. De mais preferência, a planta monocotiledônea é uma planta de lavoura selecionada a partir do grupo que consiste em: plantas de milho, arroz, sorgo, trigo, centeio, milheto, cana-de-açúcar, aveia, triticale, grama de turfa e "switchgrass". Em uma modalidade específica a planta monocotiledônea é uma planta de milho. As partes da planta incluem, sem limitação, a semente, endosperma, óvulo, pólen, folha, caule e raiz. Em uma modalidade específica, a parte da planta é uma semente. A invenção também inclui e provê células e tecidos de plantas transformadas produzidas pelo método.

Os exemplos que se seguem ilustram o desenvolvimento deste método.

30 EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem são incluídos para a ilustração de modalidades da invenção. Devem ser apreciadas por aquelas pessoas ver-

sadas na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que se seguem representam as técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na pratica da invenção. No entanto, aquelas pessoas versadas na técnica devem, na luz da presente descrição, apreciar que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que estão descritas e ainda ser obtido um resultado parecido ou similar sem que se afaste do conceito, espírito e âmbito da invenção. Mais especificamente, se tornará aparente que determinados agentes que estão tanto quimicamente como fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelo agente descrito aqui embora os mesmos resultados ou resultados similares possam ser alcançados. Todos esses substitutos similares e as modificações aparentes àquelas pessoas versadas na técnica estão destinadas a ficar dentro do espírito, âmbito e conceito da invenção como definida pelas reivindicações em anexo.

Exemplo 1

15 Construtos de Ácido Nuclêico e Agentes de Transformação

Este exemplo descreve a fabricação dos construtos de DNA e a transformação dos construtos de DNA na cepa AB1 da *Agrobacterium* (uma cepa C58 desarmada) usada para a transformação de embriões imaturos de milho. O plasmídeo pMON 97367 contém um gene cp4 como o marcador selecionável e um gene gus como o marcador triável acionado pela actina química do arroz e o promotor da actina do arroz, respectivamente. As cepas da *Agrobacterium* foram preparadas para a transformação essencialmente de acordo com os procedimentos descritos em outros locais, tais como em Cai et al.; Publicação do Pedido de Patente U.S. 2004/00244075).

25 Exemplo 2

Melhorando o Resultado da Transformação

Este exemplo descreve o desenvolvimento de um método revisado com a utilização de meios líquidos durante as etapas de proliferação de callus, seleção e durante as etapas de regeneração com a finalidade de desenvolver um método de alto enchimento simplificado, necessitando de menos manipulação dos tecidos e que pode ser automatizado. A Figura 1 mostra um projeto experimental para esse protocolo de cultura líquida de 8 se-

manas ("Liquid Plug"- FIGURA 1, diagrama do meio). A Tabela 4 exibe os resultados quando comparados com o método essencialmente de Cai et al., (U.S. 2004/0244075, isto é, o diagrama de topo da Figura 1). O método revisado também é modificado a partir daquele encontrado no Exemplo 3, em que as ex-plantas foram transferidas para um quarto meio (Lynx 2063) depois do primeiro meio durante de uma a duas semanas a 30°C no escuro, transferidas para um 2º meio modificado (como por exemplo, 2068, isto é o 2202 adicionado com AgNO_3) e em seguida transferidas para um quinto meio (como por exemplo, o Lynx 2066) depois do segundo meio durante uma semana a 27°C no escuro.

Como observado acima, determinados métodos de transformação do milho estão descritos na Publicação do Pedido de Patente U.S. 2004/0244075 (Cai et al.) e as várias composições de meios usadas também estão descritas na mesma. A Tabela 4 mostra que as plantas transgênicas podem ser produzidas dentro de 8 semanas fazendo as modificações com relação ao método de Cai et al., incluindo a cultura no 1º meio de cultura durante um período prolongado, reduzindo o tempo gasto no 4º meio de cultura, reduzindo o tempo gasto no 5º meio de cultura, e reduzindo o tempo de cultura gasto no meio de formação de raiz usado no corrente método (Tabela 1). Além disso, os 1º, 2º, 3º e 5º meios foram modificados (ver as Tabelas 1 e 2) através da adição de citoquinina e redução da auxina, através da redução substancial da citoquinina e da adição de uma pequena quantidade de auxina e aumentando a quantidade de sacarose, pela remoção de todos os reguladores de crescimento e aumentando a quantidade de sacarose e adicionando uma pequena quantidade de citoquinina e de auxina e aumentando a sacarose, respectivamente. Por exemplo, o Lynx 1233 usado em um método convencional descrito em Cai et al. não sustenta o crescimento e o desenvolvimento prolongado de ex-plantas nem sustenta a formação do primórdio de brotos como o 1º meio (Lynx 1947) da corrente invenção. O Lynx 1278 de Cai et al. tem funções similares as do Lynx 2063 da corrente invenção. A diferença principal entre esses dois sistemas está na área da regeneração. A regeneração de plantas pelo método de Cai et al. usa uma etapa de

alto pulso de citoquinina (Lynx 1073) seguida pelo alongamento do broto (Lynx 1071) e finalmente a formação da raiz das pequenas plantas acompanhada pelo crescimento e desenvolvimento no Lynx 1084. Em contraste, a regeneração através do método corrente é conseguida pelo desenvolvimento simultâneo do broto e da raiz através de uma abordagem em uma etapa de auxina (Lynx 2068 e Lynx 2066). O crescimento e o desenvolvimento finais das pequenas plantas são conseguidos em um meio isento de regulador de crescimento, Lynx 2067.

Tabela 4. Produção de plantas transgênicas dentro de 8 semanas com a utilização de um método de meios de cultura líquidos. % de TF é a média de pelo menos 3 experimentos independentes e está baseada na % de eventos independentes de plantas transgênicas.

Tratamento	Nº de explantas para o meio de seleção	Nº de Eventos Produzidos	TF (%)
Método de controle	150	55	36,7
Método de meios líquidos	210	125	59,5

Exemplo 3

Método de Transformação

Este exemplo descreve um método de transformação, incluindo as etapas de regeneração (Figura 1, esquema de "Transformação rápida", diagrama do final), através do qual é obtida depois de cerca de tão pouco como 6 semanas de crescimento, uma planta regenerada em um meio de crescimento sólido (como por exemplo, uma bucha de crescimento). Em geral, os embriões imaturos (IEs) foram retirados manualmente ou através de um aparelho de jato fluido como descrito na Patente U. S. 7.150.993 ou na Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 2005/0246786, e inoculados com células de *Agrobacterium* que contém o construto de DNA de interesse. Os embriões inoculados foram cultivados no primeiro meio (Lynx 1947) durante cerca de 7 (opcionalmente até cerca de 14) dias a 23°C durante um dia e a 30°C durante o resto do tempo no escuro, depois do que as ex-plantas foram transferidas para um prato Petri que continha um suporte tal como feltro e/ou papel de filtro (como por exemplo, Ahlstrom tipo 610, 8,22 cm; Ahlstrom

Corp., Helsinki, Finlândia) e 10 ml do segundo meio (Lynx 2202) e os pratos foram incubados a 30°C sob condições de escuro durante cerca de 1 semana. Depois de uma semana na presença do segundo meio, o meio velho foi retirado por aspiração e 10 ml do terceiro meio (Lynx 2067) foram adicionados e os pratos foram incubados a 30°C no escuro durante mais uma semana. Nos intervalos aproximados de uma semana depois da transferência inicial para o terceiro meio, o meio velho foi retirado por aspiração e cerca de 15 a 30 ml do terceiro meio foram adicionados de novo e os pratos foram incubados a 27 a 30°C em claro - escuro 16/8. Depois da 6ª semana após a transformação, as plantas foram transferidas para bucha que continham um meio de crescimento sólido, sob condições não estéreis para o endurecimento e em seguida para potes para o crescimento e o desenvolvimento adicionais dentro das 2 semanas seguintes. As composições dos meios usadas estão mostradas na Tabela 2.

Exemplo 4.

O Uso da Citoquinina Facilita a Produção Rápida de Brotos e de Plantas.

Este exemplo ilustra o uso da citoquinina para a iniciação antecipada da formação de primórdios de brotos, para a produção mais rápida de plantas transgênicas. Os experimentos foram realizados com e sem o BAP no primeiro meio (ver a Tabela 2 com relação aos componentes) e os resultados estão mostrados na Tabela 5. A Figura 2 mostra a produção de primórdios de brotos no primeiro meio. Os resultados também mostram uma melhora significativa na frequência de transformação quando a citoquinina foi usada durante esta etapa do processo de transformação.

Tabela 5. O uso de uma citoquinina durante a primeira etapa do processo de transformação aumenta a frequência de transformação devido à formação precoce dos primórdios de broto. A % de TF é a média de 4 experimentos e está baseada na % de eventos de plantas transgênicas independentes.

Tratamento (1 semana)	Nº de embriões para seleção	Nº Total de Eventos Produzidos	%TF Média ± SD
Lynx 1898; Sem BAP	315	41	13,0 ± 7,4
Lynx 1947; BAP	365	179	49,0 ± 2,3

Exemplo 5

Simplificação do Método através da Redução da Proliferação de Callus e do Período de Seleção.

- 5 Este exemplo demonstra a produção de plantas transgênicas dentro de 7 e de 6 semanas, pela diminuição em 1 semana do tempo gasto em Lynx 2063 e limitando desse modo a proliferação de callus. O esboço e o resultado do experimento estão mostrados na Tabela 6. Os resultados sugerem que uma fase de formação de callus reduzida pode ser usada sem afetar a TF. Os resultados também sugerem que uma redução adicional ou a
- 10 eliminação da fase de formação de callus pode ser possível o que pode acelerar o processo da produção de plantas transgênicas.

- 15 Tabela 6. Produção de plantas transgênicas dentro de 7 ou 6 semanas através da redução da fase de formação do callus. A % de TF é a média de pelo menos 3 experimentos independentes e está baseada na % de eventos de plantas transgênicas independentes.

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Cocultura e Retardo; 8-10 dias	Lynx 1947	Lynx 1947	Lynx 1947
1ª transferência, 1 semana	Lynx 2063	Lynx 2063	Lynx 2063
2ª transferência, 1 semana	Lynx 2063	Lynx 2068	Lynx 2068
3ª transferência, 1 semana	Lynx 2068	Lynx 2066	Lynx 2067
4ª transferência, 1 semana	Lynx 2066	Lynx 2067	Lynx 2067
5ª transferência, 2 semanas	Lynx 2067	Lynx 2067	bucha (6 semanas)
6ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	bucha (7 semanas)	N/A
7ª transferência	bucha (8 semanas)	N/A	N/A
TF (Média $\pm$ SD)	16,9 $\pm$ 1,0	26,0 $\pm$ 10,9	22,0 $\pm$ 5,9

Exemplo 6

Desenvolvimento do Protocolo de Transformação de Seis Semanas pela

Eliminação da Proliferação de Callus Durante a Seleção.

Este exemplo demonstra a produção de plantas transgênicas dentro de seis semanas através da eliminação da etapa de proliferação do callus e de seleção (Lynx 2063, 4º meio) e de uma das etapas de regeneração no quinto meio, completamente. O projeto experimental e os resultados estão mostrados na Tabela 7. Este experimento incluiu um método já encurtado (tratamento 1) com uma semana de etapa de proliferação de callus/seleção no quarto meio e comparou o mesmo com um método que inclui a regeneração direta no segundo meio que continha um nível de 2,4 D mais baixo do que o primeiro meio. Dessa forma, além da redução do nível de auxina, uma proporção aumentada de regulador do crescimento da formação de broto para a auxina também é contemplada. Este exemplo demonstra que a necessidade por relação a uma etapa de crescimento de callus e proliferação durante a seleção (o quarto e o quinto meio, por exemplo, os meios 2063 e 2066) pode ser eliminada e é importante para a obtenção de eventos transgênicos em uma quantidade de tempo reduzida.

Tabela 7. Produção de Plantas Transgênicas através da Eliminação da Etapa de Proliferação de Callus. A % de TF é a média de pelo menos três experimentos independentes e está baseada na % de eventos de plantas transgênicas independentes.

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2
Cocultura e Retardo; 8-10 dias	Lynx 1947	Lynx 1947
1ª transferência, 1 semana	Lynx 2063	Lynx 2202
2ª transferência, 1 semana	Lynx 2068	Lynx 2068
3ª transferência, 1 semana	Lynx 2066	Lynx 2067
4ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067
5ª transferência, 2 semanas	Lynx 2067	Lynx 2067

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2
6ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Bucha
7ª transferência	Bucha	
TF (Média $\pm$ SD)	18,8 $\pm$ 9,4	40,9 $\pm$ 18,7

Exemplo 7

Alguma Proliferação de Callus Durante a Cocultura é Necessária para TF melhorada.

Este exemplo ilustra o papel da proliferação de células de ex-plantas durante o meio de cocultura e de retardo (o primeiro meio) sobre a TF. O crescimento do callus das ex-plantas foi controlado através do nível de 2,4 D no meio de cocultura/retardo. Como mostrado na Tabela 8, o efeito de uma semana de cultura no primeiro meio (por exemplo, o Lynx 2232, 1947, 2233 ou 1898; Tabela 2) foi testado seguido por um protocolo de transformação de seis semanas. É evidente a partir dos resultados que a quantidade de formação de callus durante a cocultura/retardo antes da regeneração determina a TF. Um nível de auxina em uma concentração mais baixa, isto é de 0,2 mg/l em Lynx 2232 tinha TF zero enquanto que as ex-plantas cultivadas em 1947 tendo 0,5 mg/l deu uma TF de cerca de 35%. Os resultados sugerem que alguma proliferação de callus antes do crescimento no 2º meio (incluindo a regeneração) é necessária para permitir a formação posterior de botão do broto. A quantidade de formação de callus pode ser otimizada através da variação dos parâmetros de cultura de tecido incluindo entre outros, os componentes do meio e a duração do crescimento.

Tabela 8. Fase de callus ótima durante a cocultura e o retardo tem impacto sobre a TF. A % de TF é a média de pelo menos três experimentos independentes e está baseada na % de eventos de plantas transgênicas independentes.

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Cocultura e Retardo; 1 semana (7-10 dias)	Lynx 2232	Lynx 1947	Lynx 2233	Lynx 1898

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
1ª transferência; 1 semana	Lynx 2202	Lynx 2202	Lynx 2202	Lynx 2202
2ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067
3ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067
4ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067
5ª transferência, 1 semana	Bucha	Bucha	Bucha	Bucha
TF	0	35,4	0,7	6,1

Exemplo 8

Simplificações Adicionais Para o Protocolo

Este exemplo ilustra a redução da duração do crescimento de ex-plantas no meio de regeneração (2202) para simplificar ainda mais os métodos permitindo ainda ao mesmo tempo a obtenção de plantas dentro de 6 semanas sem que haja efeitos adversos sobre TF. Neste estudo mostrado na Tabela 9, o efeito de cada uma semana no segundo meio (2202; 2068) (tratamento 1) foi comparado com somente uma semana no segundo meio 2202 (tratamento 2 e 3) seguido pelo alongamento no terceiro meio (2067). O segundo meio 2202 é idêntico ao 2068 exceto em que o 2068 não tem 3,4 mg/l de nitrato de prata. O terceiro meio (2067) foi adicionado nos intervalos regulares (tratamento 2) ou o meio gasto foi removido e meio fresco foi adicionado (tratamento 3). A substituição ou a diluição do 2202 com o 2067 é provável em aumentar a regeneração. A faixa de tamanho das plantas produzidas através deste método foi adequada para o transplante a uma bucha e teve uma taxa de sobrevivência de quase 100%. A análise do número de cópias de aproximadamente 170 eventos com a utilização da análise Taqman® na região 3' da sequência do gene da terminação de transcrição pin II presente na unidade de expressão do construto de DNA usado para a transformação revelou que cerca de 78% das plantas continham 1 a 2 cópias, indicando a produção de uma porcentagem mais alta de plantas que

possam ser usadas quando comparada com somente cerca de 60% das plantas com 1 a 2 cópias como tipicamente obtidas com o método corrente. Somente três plantas do experimento tiveram zero cópias indicando muito poucas escapadas. As plantas transgênicas também podem ser produzidas para transplante dentro de tão pouco quanto 4 semanas como mostrado na Figura 3A.

Tabela 9. Produção de plantas transgênicas usando um novo meio de regeneração e de alongamento. A % de TF é a média de pelo menos três experimentos independentes e está baseada na % de eventos de plantas transgênicas independentes.

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Cocultura e Retardo; 1 semana (7 -10 dias)	Lynx 1947	Lynx 1947	Lynx 1947
1ª transferência; 1 semana	Lynx 2202	Lynx 2202	Lynx 2202
2ª transferência, 1 semana	Lynx 2068	Lynx 2067	Lynx 2067
3ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067
4ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067
5ª transferência, 1 semana	Lynx 2067	Lynx 2067	Lynx 2067
6ª transferência	Bucha	Bucha	Bucha
TF	27,1	33,8	40,6

Exemplo 9

Protocolos Alternativos de Duas ou Três Etapas.

Este exemplo ilustra a produção de plantas transgênicas por reduzir ainda mais o número de etapas de transferência e/ou as etapas de as-
piração/adção de meios e/ou meios como mostrado na Figura 4 e nas Tabe-
las 10 e 11. Um componente importante do presente método é uma fase de
callus curta enquanto ao mesmo tempo acelerando a regeneração. Nessa
abordagem, em seguida da cocultura/retardo (1º meio), os tecidos foram
transferidos para o meio de regeneração (2º meio; como por exemplo, o

2202) durante uma semana para acelerar o processo de regeneração (Tabela 10). No entanto, uma tal etapa pode interferir com a facilidade de automação deste método na medida em que este 2º meio, que compreende a auxina que retarda o alongamento, poderia necessitar de ser removido antes da
 5 adição do 3º meio (como por exemplo, o meio de crescimento e alongamento 2067). Esse problema foi superado através da identificação de um segundo meio diferente sem nenhuma auxina porém com alguma citoquinina (como por exemplo, 2347, 2348, 2415, 2414) na medida em que o meio de regeneração que pode sustentar a regeneração, alongamento e o crescimento
 10 no lugar do 2º meio (isto é, do 2202), removendo por meio disso a necessidade da remoção por aspiração do meio. Nos tratamentos 2, 3, 4 e 5 depois da primeira transferência, o 2067 isento de regulador de crescimento foi adicionado aos recipientes. O 2º meio usado no tratamento 5 é uma versão modificada do Lynx 2067 na medida em que ele contém uma pequena quantidade de BAP e pode ser usado para a regeneração e o alongamento na
 15 medida em que ele não contém nenhuma auxina (por exemplo, o 2347) como mostrado com o sucesso do tratamento 5. Desse modo, como mostrado na Figura 4, parte inferior, um protocolo rápido e simples de transformação de planta exibindo um TF excelente, e consistindo em somente duas etapas de meios, é conseguido. Além do mais, a capacidade de simplesmente adicionar meio sem a remoção por aspiração do meio usado torna o sistema acessível para a automação.

Tabela 10: Produção de plantas transgênicas em três etapas de cultura.

Nº Experimento	Tratamento	Nº de plantas para seleção	Nº total de eventos produzidos	%TF
8205-1	8 semanas - Líquido	110	46	41,8
8205-2	6 semanas - Líquido	100	38	38,0
8205-3	6 semanas- líquido com transformação em três etapas	48	20	41,7

25 Como mostrado na Tabela 11, a transformação foi alcançada através de todos os três tratamentos, indicando que a eliminação do meio

contendo a auxina (2202) é possível sem afetar a TF. Além disso, a transformação com a utilização de meio de regeneração e de alongamento sem auxina e com alguma citoquinina em seguida à cocultura/retardo foi possível como mostrado com 2347, 2348, 2414, e 2415 que contem glifosato na concentração mostrada entre parênteses.

Tabela 11. Projeto Experimental para Testar a Produção de Plantas Transgênicas Em Duas Etapas. Para as composições dos meios ver as Tabelas 2 e 3.

ETAPAS	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
Cocultura e Retardo; 10 dias	Lynx 1947				
1ª transferência; 1 semana, escuro 30 C	2202	2348 (0,2 mM)	2415 (0,1 mM)	2414 (0,02mM)	2347 (0,1 mM)
2ª transferência; 1 semana, escuro, 30 C	Lynx 2067				
4ª transferência; 3 semanas, claridade 27 C	Lynx 2067				
5ª transferência	Bucha				
TF±SD	48,9±9,5	46,5±9,7	39,5±12,5	40,5±7,5	42,5±9,7

Exemplo 10

10 Transformação de Genótipos de Milho Recalcitrantes

Este exemplo ilustra a produção de plantas transgênicas com a utilização de uma variedade de milho de elite recebedora que foi descoberta como possuindo uma resposta de cultura embriogênica fraca (isto é, é considerada "recalcitrante") com relação a um genótipo de controle de elite comumente usado para a transformação através do método que compreende uma etapa separada de formação de callus durante a seleção como descrito por Cai et al. Somente um evento transgênico foi obtido a partir de 6 experimentos com a utilização de cerca de 1172 ex-plantas com a linha de controle, enquanto que dois estudos com a utilização dos métodos de transforma-

ção rápida da presente invenção resultaram em TF de cerca de 16,9% e 19,5%, indicando que esses métodos podem ser aplicados com sucesso as linhas recalcitrantes. Na Tabela 12, a % de TF é a média de 4 experimentos independentes e é baseada na % de eventos de plantas transgênicas independentes. Em alguns dos experimentos uma TF de cerca de 30 a 40% pode ser obtida.

Tabela 12. RLC modificado para facilitar a produção de plantas de uma linha de elite em cerca de 6 semanas.

ETAPAS	Tratamento 3	Tratamento 4
Cocultura e retardo	Lynx 1947	Lynx 1947
2ª transferência (escuro 30°C)	Lynx 2063 (proliferação de callus e seleção)	Lynx 2202 (regeneração)
3ª transferência (escuro 30°C)	Lynx 2063 (proliferação de callus e seleção)	Lynx 2202 (regeneração)
4ª transferência (escuro 30°C)	Lynx 2068 (regeneração)	Lynx 2068 (regeneração)
5ª transferência (clareza 27°C)	Lynx 2067 (alongamento e crescimento)	Lynx 2067 (alongamento e crescimento)
6ª transferência (clareza 27°C)	Lynx 2067 (alongamento e crescimento)	Lynx 2067 (alongamento e crescimento)
para a bucha	para a bucha	para a bucha
TF %	16,9	19,5

Exemplo 11

10 Métodos para a Avaliação da Capacidade de Transformação de Linhas de Milho

Este exemplo ilustra a identificação rápida de genótipos para a competência de transformação em umas poucas etapas simples. Neste método, as ex-plantas são cultivadas em um meio capaz de produzir primórdios de broto em um tempo curto (meio tal como o 1947; Tabela 2). Uma semana depois da cultura, as ex-plantas são transferidas para o meio de regeneração/alongamento (como por exemplo, o Lynx 2424; Tabela 13) durante 2 a 3 semanas a 30°C em condições de escuro. As linhas que produzem as pequenas plantas podem ser transferidas para um meio de crescimento (como por exemplo, o Lynx 2427; Tabela 13) durante um período de 2 a 3 sema-

nas. As linhas capazes da produção e/ou regeneração de botões de brotos através dessa abordagem de varredura serão acessíveis a um procedimento de transformação rápida, tal como o esboçado acima, sem a necessidade com relação a uma etapa separada de formação de callus durante a cultura das mesmas.

Tabela 13. Meios Usados para a Avaliação da Capacidade de Transformação de Linhas de Milho.

Componentes dos meios /l (Fornecedores)	2424	2427
MS Sais basais (Phytotech)	4,33 g	4,33 g
MS Vitaminas (100X) (Phytotech)	10 ml	10 ml
HCl de Tiamina (Sigma)	0,5 mg	0
Sacarose (Phytotech)	50 g	60 g
Prolina (Sigma)	1,38	0
Ácidos Casamino (Difco)	0,5 g	0
Ajustar o pH para	5,8	5,8
Phytagar (Gibco)	6	5,5 g
Aditivos pós-autoclave		
BAP (Sigma)	0,01 mg/l	0

Exemplo 12

Tempo Reduzido do Ciclo do Desenvolvimento do Produto Através da Transformação Rápida.

A invenção também proporciona uma janela expandida de prioridade para o desenvolvimento de produto de planta transgênica. Esse desenvolvimento de produto é um processo longo - ele pode levar no mínimo de 7 a 8 anos a partir de uma idéia e de um gene até um produto comercial na forma de uma semente de milho híbrido vendida aos cultivadores. O campo da biotecnologia de plantas, e especificamente do desenvolvimento de produto de milho transgênico, é altamente competitivo e a remoção de um ou mais anos a partir de um ciclo de desenvolvimento de produto pode dar a uma companhia um retorno colossal em participação no mercado e em renda.

Usando um protocolo de transformação de planta (por exemplo, o milho) que leva de 11 a 12 semanas para a produção de plantas transformadas, a janela de desenvolvimento tipicamente se prolonga a partir do final de novembro até o início de janeiro. Em seguida à coleta e a análise de dados de produção do Meio Oeste dos Estados Unidos em qualquer ano dado, a janela de tempo que permanece depois da coleta de dados até o início de novas transformações com base naqueles dados, embora sendo capaz de produzir transformantes resultantes como híbridos na segunda estação subsequente de plantio do Meio Oeste é limitada para tão tarde como o início de janeiro, devido às atividades subsequentes esboçadas na Figura 5. Essas atividades incluem o cultivo de geração R0 da planta e a execução da caracterização do evento, completar do desenvolvimento da planta R0 incluindo a polinação e preparação de sementes, desenvolvimento da planta R1 incluindo a identificação de homozigotos e a coleção de sementes e finalmente o cultivo de outra geração para criar os híbridos e distribuir as sementes para os locais dos testes de campo.

Uma aceleração do desenvolvimento do produto de milho transgênico é conseguida através do encurtamento do tempo necessário para a transformação do milho (tempo a partir da indução do DNA dentro das células até as plantas no solo) tal como um ano de calendário total é removido do ciclo do desenvolvimento do produto, da linha de desenvolvimento do produto de milho. Isso é conseguido através do encurtamento do protocolo de transformação do milho de 11 a 12 semanas ou mais, para 6 a 7 semanas ou menos como mostrado em azul na Figura 5. Isso expande a "janela de prioridade de desenvolvimento", que é definida como o tempo a partir de quando os dados da produção do Meio Oeste dos Estados Unidos estejam disponíveis em qualquer dada estação de cultivo até a última data possível na qual uma transformação possa ser iniciada e as linhas transformadas resultantes dessas transformações possam ser testadas com relação à produção nos Estados Unidos como híbridos, na segunda estação de cultivo sequencial nos Estados Unidos, subsequente ao tempo da transformação. Os dados de rendimento gerados no Meio Oeste são importantes para o desen-

volvimento do produto nos Estados Unidos sem que seja levado em conta o produto. A utilização de um protocolo de transformação de 6 a 7 semanas, expande a janela de prioridade de desenvolvimento em 5 a 6 semanas (Figura 5) permitindo mais tempo para tomar decisões importantes para o negócio ou até duas vezes a capacidade de transformação sem aumento em recursos para transformação em uma estrutura de tempo de tal forma que o teste da produção dos transformantes iniciados na janela de prioridade de desenvolvimento seja possível na segunda estação de plantio subsequente (Figura 5) no lugar de esperar um ano de calendário total antes de testar a produção desses transformantes.

Todas as composições e métodos descritos e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem a experimentação indevida na luz da presente descrição. Embora as composições e os métodos desta invenção tenham sido descritos em termos das modalidades ilustrativas precedentes, se tornará aparente para aquelas pessoas versadas na técnica que podem ser aplicadas variações, trocas, modificações e alterações na composição, métodos e nas etapas ou na sequência de etapas do método descrito aqui sem que se afastem do verdadeiro conceito, espírito e âmbito da invenção. De modo mais específico, se tornará aparente que determinados agentes que sejam ambos quimicamente e fisiologicamente relacionados possam ser substituídos pelos agentes descritos aqui, neste pedido de patente embora o mesmo resultado ou resultado similar possa ser conseguido. Todos esses substitutos similares e modificações aparentes àquelas pessoas versadas na técnica estão destinadas a ficar dentro do espírito, âmbito e conceito da invenção como definidos pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma planta monocotiledônea transgênica que compreende:

5 a) transformar uma ex-planta com pelo menos um primeiro DNA selecionado;

b) cultivar a ex-planta em um primeiro meio de cultura que compreende uma proporção efetiva de citoquinina e auxina para promover o desenvolvimento de estruturas que podem se regenerar capazes da formação de raiz e de brotos; e

10 c) cultivar a ex-planta em pelo menos um segundo e/ou um terceiro meio de cultura que sustente o crescimento simultâneo dos tecidos da raiz e do broto, para a produção de uma planta monocotiledônea transgênica regenerada;

15 em que a planta monocotiledônea transgênica regenerada é produzida dentro de 4 a 8 semanas a partir da transformação da ex-planta.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, que compreende ainda a transferência da planta monocotiledônea transgênica regenerada para um meio de crescimento de plantas.

20 3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o meio de crescimento é uma matriz não estéril.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a matriz não estéril está compreendida em um bujão.

25 5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as estruturas que podem ser regeneradas são formadas dentro de cerca de 6 a 14 dias a partir da transformação da explanta.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa b) é completada dentro de cerca de 6 a 14 dias da transformação da planta.

30 7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que etapas a) e b) são executadas sem a proliferação de um callus durante mais do que cerca de 10 dias até duas semanas.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro meio de cultura compreende um composto bactericida.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os segundo e terceiro meios de cultura compreendem sacarose em uma concentração mais alta do que é encontrada no primeiro meio de cultura.

5 10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro meio de cultura compreende Lynx 1947.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa (c) compreende a cultura da ex-planta em um meio de cultura líquido isento de um regulador de crescimento de planta que sustente o crescimento simultâneo dos tecidos da raiz e do broto, para a produção de uma planta monocotiledônea transgênica regenerada..

10

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o meio de cultura que sustenta o crescimento simultâneo dos tecidos da raiz e do broto compreende o Lynx 2067.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa (b) é executada durante uma duração a partir de cerca de 6 dias até cerca de 12 dias.

15

14. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa (c) é iniciada dentro de cerca de 4 a 8 semanas da transformação da ex-planta.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a proporção de citoquinina para a auxina no primeiro meio de cultura é a partir de cerca de 0,005 até cerca de 0,03 (p/p).

20

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a proporção de citoquinina para a auxina no primeiro meio de cultura é a partir de cerca de 0,005 até cerca de 0,03 em uma base molar.

25 17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a citoquinina é selecionada a partir do grupo que consiste em BAP, zeatina, quinetina, e TDZ; e a auxina é selecionada a partir do grupo que consiste em IAA, 2,4-D, NAA, IBA, e dicamba.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, e em que etapa (c) também compreende a cultura da ex-planta em um segundo meio de cultura que compreende uma proporção aumentada de um regulador de crescimento da formação de broto para a auxina, com relação ao primeiro meio para a

30

promoção do desenvolvimento da raiz ou raízes e broto ou brotos de forma simultânea.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o meio da etapa (c) é Lynx 2202 e /ou Lynx 2068.

5 20. Método de acordo com a reivindicação 1, que compreende também o cultivo da ex-planta em um segundo e/ou um terceiro meio de cultura isento de reguladores de crescimento de planta.

21. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a proporção do regulador da formação de broto para a auxina no segundo meio é a
10 partir de cerca de 0,02 até cerca de 0,06 (p/p).

22. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o segundo meio é o Lynx 2202 ou o Lynx 2068.

23. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o meio de crescimento fresco não é adicionado em seguida ao início da etapa (c).

15 24. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o primeiro meio de cultura compreende cerca de 0,001 mg/l até cerca de 10 mg/l de citoquinina e cerca de 0,1 mg até cerca de 10 mg/l de auxina.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a ex-planta é ainda cultivada em um quarto meio entre a cultura no primeiro e no segundo meio, em que o quarto meio compreende uma quantidade efetiva de uma auxina e citoquinina para a promoção da proliferação de um callus.
20

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o quarto meio é o Lynx 2063.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, em que a ex-planta é ainda cultivada em um quinto meio entre o cultivo no segundo e no terceiro meio, em que o quinto meio compreende uma quantidade efetiva de citoquinina para a promoção do crescimento de broto.
25

28. Método de acordo com a reivindicação 27, em que o quinto meio é o Lynx 2066.

30 29. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a transformação da ex-planta compreende a transformação mediada por bactéria.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a trans-

formação mediada por bactéria é executada com a utilização de uma bactéria selecionada a partir do grupo que consiste em *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., e *Bradyrhizobium* sp.

5 31. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o segundo e/ou o terceiro meio de cultura compreendem uma quantidade reduzida de auxina com relação aquela encontrada no primeiro meio de cultura, citocinina, ácido abscísico ou uma combinação.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o segundo e/ou o terceiro meios de cultura compreendem menos do que a metade
10 tanto de auxina ou de regulados do crescimento de planta do tipo da auxina como o primeiro meio.

33. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro meio de cultura e o meio de cultura que sustenta o crescimento simultâneo dos tecidos da raiz e do broto são meios líquidos.

15 34. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro meio de cultura é um meio semi sólido.

35. Método de acordo com a reivindicação 1, em que cada meio usado em seguida ao primeiro meio de cultura é um meio líquido.

20 36. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as etapas b) e c) são executadas em um único recipiente.

37. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a planta monocotiledônea é uma planta de milho, arroz, sorgo, trigo, centeio, milheto, cana-de-açúcar, aveia, tritcale, "switchgrass", ou grama de turfa.

25 38. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a monocotiledônea é o milho.

39. Método para a expansão de uma janela de prioridade de desenvolvimento para a produção de plantas transgênicas, que compreende:

a) selecionar um segmento de DNA candidato de interesse para a produção de uma planta transgênica com base, pelo menos em parte em
30 dados coletados em um primeiro teste de campo;

b) preparar uma planta monocotiledônea transgênica que compreenda o segmento de DNA candidato através do método da reivindicação

1; e

c) analisar a planta transgênica com relação do fenótipo desejado e/ou genótipo em pelo menos um segundo teste de campo realizado em uma estação de cultivo em seguida àquela na qual o primeiro teste de campo foi realizado.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, em que um ou ambos dos primeiro teste de campo ou segundo teste de campo são realizados no meio oeste dos Estados Unidos.

41. Método de acordo com a reivindicação 39, em que a análise da planta transgênica compreende a medição do desempenho agrônômico da mesma.

42. Método de acordo com a reivindicação 39, em que o segundo teste de campo é um teste de produção híbrida.

43. Método de acordo com a reivindicação 39, em que o Segundo teste de campo é executado em duas estações de cultivo depois do primeiro teste de campo.

44. Um método para a varredura de células de uma linha de plantas de cultivo com relação a capacidade de transformação, que compreende:

(a) cultivar ex-plantas de uma planta de cultivo em um meio de cultura que sustente a produção de brotos primordiais dentro de cerca de 1 a 2 semanas;

(b) cultivar os brotos primordiais sob condições que sustente o alongamento do broto durante pelo menos uma semana adicional no escuro para a obtenção de tecido de crescimento de broto e/ou "plantículas";

(c) cultivar o tecido ou as "plantículas" da etapa (b) em um meio de crescimento de planta durante pelo menos cerca de mais uma semana para serem obtidos botões de plantas e/ou plantas;

em que a capacidade de transformação das células é medida através da capacidade dos botões primordiais de produzirem botões de plantas e ou plantas seguindo a etapa (C).

FIG. 1

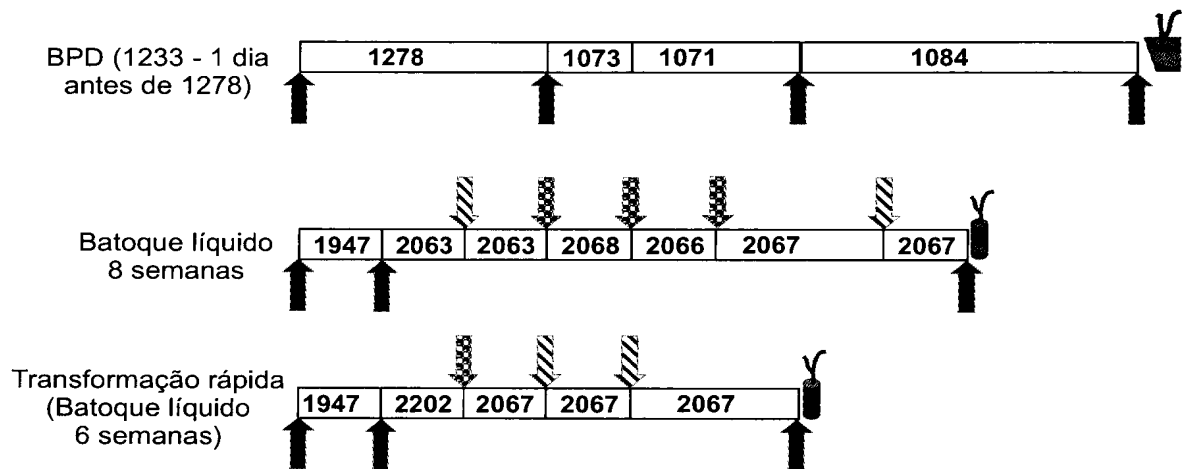


FIG. 2

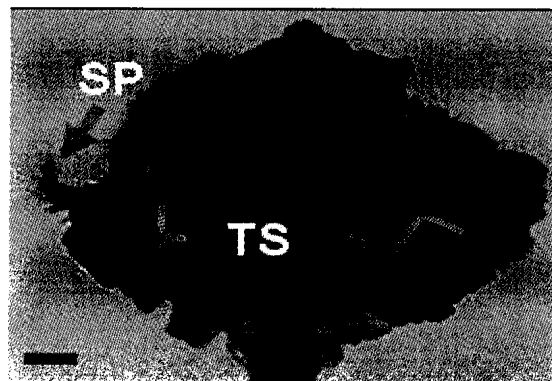


FIG. 3



FIG. 4

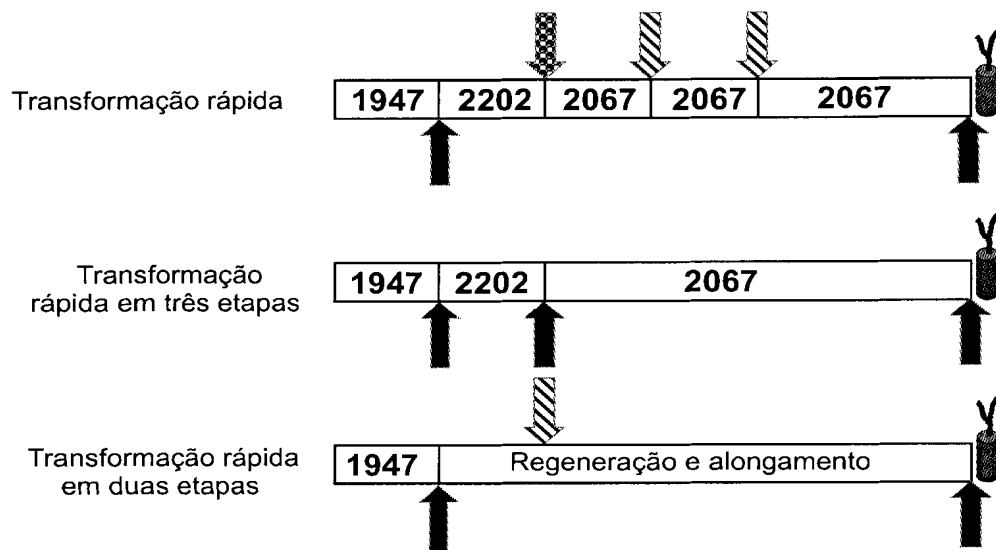
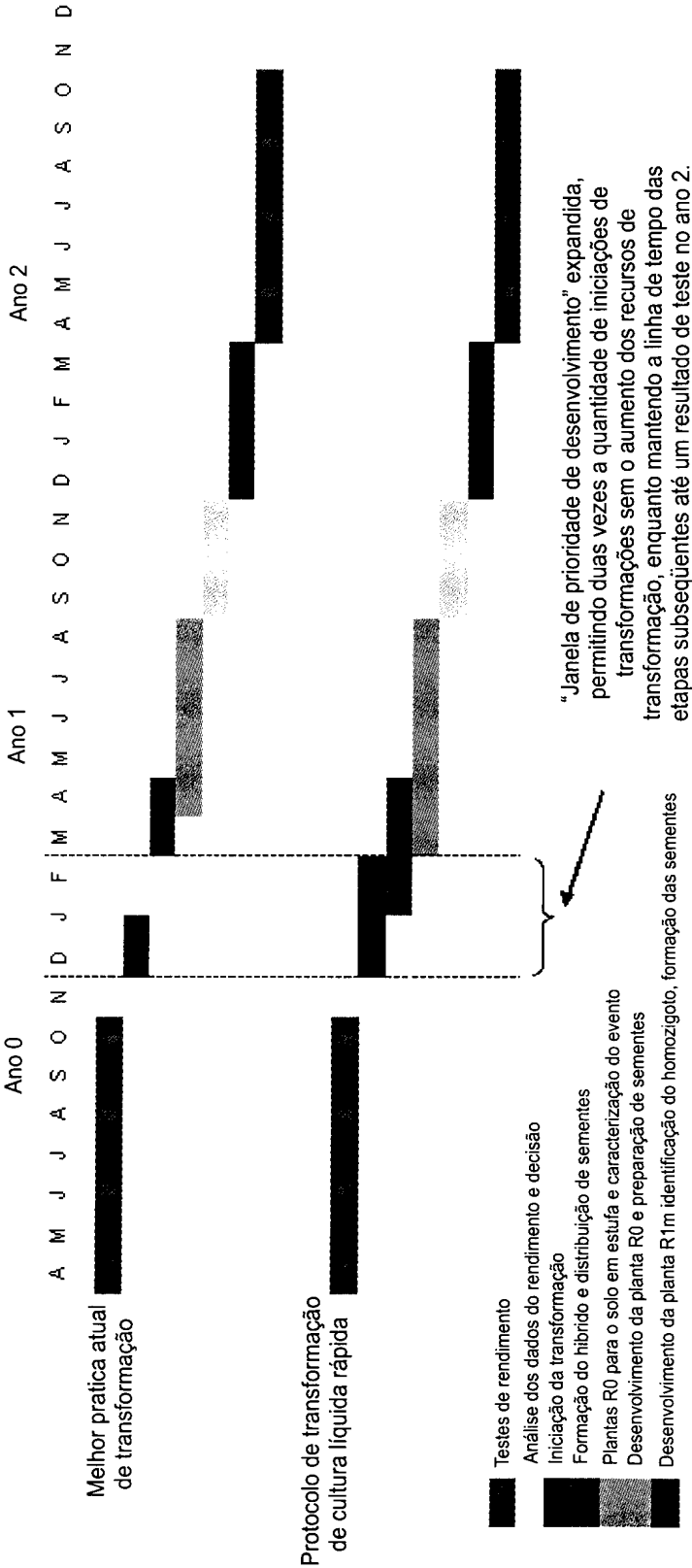


FIG. 5



RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA A TRANSFORMAÇÃO RÁPIDA DE PLANTAS MONOCOTILEDÔNEAS"**.

5 A presente invenção proporciona métodos para a transformação de plantas monocotiledôneas através de um protocolo simples e rápido, para serem obtidas plantas regeneradas capazes de serem plantadas no solo em
tão pouco como de 4 a 8 semanas. Também são providos meios de cultura e
condições de crescimento, bem como plantas e partes de plantas obtidas
através do método. Além disso, também é provido um método para a varre-
10 dura de genótipos de plantas recalcitrantes com relação à capacidade de
transformação através dos métodos da presente invenção. Também é provi-
da uma janela de desenvolvimento de prioridade de um sistema para a pro-
dução de plantas transgênicas através dos métodos da presente invenção.