



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

(21) **PI0610816-4 A2**

(22) Data de Depósito: 15/05/2006
(43) Data da Publicação: 27/07/2010
(RPI 2064)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
C12N 9/00
C07K 14/415

(54) Título: **SEMENTE E PLANTA DE MILHO TRANSGÊNICAS, MÉTODO DE PRODUZIR A REFERIDA PLANTA, FARINHA DE MILHO COM PROTEÍNA AUMENTADA E ALIMENTO**

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2005 US 60/681,348

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

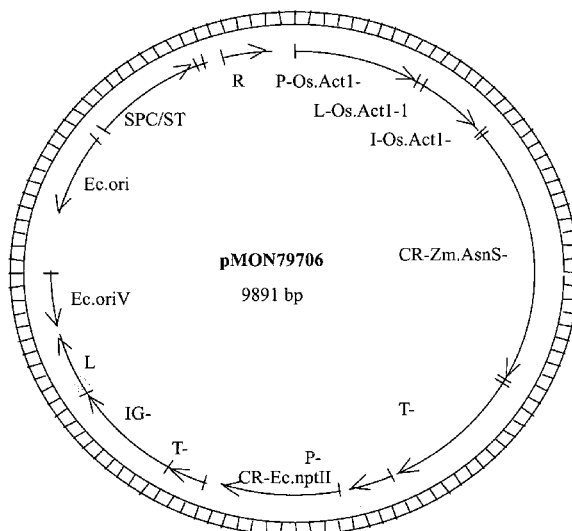
(72) Inventor(es): BO-XING QIU, BRANDON FABBRI, JAMES CROWLEY, SCOTT ANDERSEN, STEVEN E. SCREEN

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006018560 de 15/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/124678 de 23/11/2006

(57) Resumo: SEMENTE E PLANTA DE MILHO TRANSGÊNICAS, MÉTODO DE PRODUZIR A REFERIDA PLANTA, FARINHA DE MILHO COM PROTEÍNA AUMENTADA E ALIMENTO. A presente invenção refere-se a uma semente e planta de milho com níveis realçados de proteína e aminoácidos. A invenção da mesma forma se refere ao constructo de DNA que fornece expressão em células de milho transgênicas de uma enzima de asparagina sintetase. Os constructos de DNA são empregados em um método para produzir sementes e plantas de milho transgênicas para selecionar plantas e sementes com níveis realçados de proteína e aminoácidos.



Ret 020080003849
Pi 0610816-4

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**SEMENTE E PLANTAS DE MILHO REALÇADAS PARA ASPARAGINA E PROTEÍNA**".
ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Este pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório dos Estados Unidos Série Nº 60/681.348 depositado em 16 de maio de 2005, a descrição total do qual está aqui incorporada por referência.

1. Campo da Invenção

A presente invenção refere-se de modo geral ao campo de biotecnologia de planta e mais especificamente ao realce de asparagina e proteína em plantas e semente de milho.

2. Descrição da Técnica Relacionada

Os fazendeiros e consumidores desejam plantas de colheita com características agrônômicas melhoradas tal como produção aumentada, produção de proteína de semente aumentada, e composição nutricional melhorada. Os componentes nutricionais desejáveis de plantas de colheita incluem, entre outros, fibra, antioxidantes tal como Vitamina E, selênio, ferro, magnésio, zinco, vitaminas B, lignans, ácidos fenólicos, aminoácidos essenciais, e fitoestrogênios. Embora esforços consideráveis em reprodução de planta tenham fornecido alguns ganhos nestas características desejadas, a capacidade de introduzir DNA não hospedeiro específico em um genoma de planta fornece outras oportunidades de geração de plantas com estas características. Em particular, ao mesmo tempo em que a produção de milho convencional aumentou continuamente durante os anos, não houve um aumento similar na capacidade de plantas de milho assimilar nitrogênio mais eficazmente ou aumentar o teor de proteína da semente.

A disponibilidade de nitrogênio tem um impacto positivo significativo na produtividade de planta, biomassa, e produção de colheita incluindo a produção de proteína de semente. Nas plantas, o nitrogênio inorgânico é assimilado do solo, reduzido à amônia, e incorporado em nitrogênio orgânico na forma da asparagina de aminoácidos transportando nitrogênio, glutamina, ácido aspártico e ácido glutâmico. A asparagina (Asn) é a molécula de transporte de amida preferida por causa de sua relação elevada de nitrogê-

nio para carbono (2N:4C versus 2N:5C) e porque ela é relativamente inerte. Asn e outros aminoácidos também são empregados quando construindo blocos para síntese de proteína.

Em plantas, Asn é sintetizada de glutamina, aspartato e ATP, em
5 uma reação catalisada pela enzima asparagina sintetase (AsnS). O glutamato, AMP e pirofosfato são formados como subprodutos. Duas formas de AsnS foram descritas: uma forma dependente de glutamina e uma forma dependente de amônia. A AsnS dependente de glutamina pode catalisar ambas as reações dependentes de glutamine e dependentes de amônia
10 embora a glutamina seja a fonte de nitrogênio preferida.

A concentração elevada de proteína é considerada uma característica de qualidade importante para a maioria das colheitas principais, incluindo soja, milho, e trigo. As variedades de milho, trigo, e soja com alto teor de proteína, por exemplo, foram identificadas por reprodução tradicional.
15 Entretanto, a maioria das linhagens de alto teor de proteína desenvolvida deste modo produziu retardamento ou outras desvantagens agrônomicas. Seria desejável se o conteúdo de proteína de colheitas, especialmente milho, pudesse ser aumentado acima dos níveis atualmente disponíveis, tanto para consumo humano quanto para uso do produto em alimentos de animal.
20 Isto ofereceria o benefício de valor de nutriente grandemente realçado quando a colheita for empregada como comida e alimento para os seres humanos e animais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um método e composições para
25 tratamento de colheitas e outros produtos de planta para aumentar o conteúdo de proteína e aminoácido em plantas. O método e composições aumentam o nível de proteína e aminoácidos livres em tecidos de milho, particularmente em sementes. Mais especificamente, uma semente e planta de milho transgênica são fornecidas as quais contenham em seu genoma uma
30 composição de DNA heterólogo que expresse um produto de gene envolvido em asparagina aumentada e biogênese de proteína aumentada. A expressão do produto realça o valor nutricional de fontes de milho de alimento e milho co-

mestível e produtos processados derivados da semente de milho transgênica ou partes desta.

Em um aspecto, a invenção fornece métodos para aumentar o conteúdo de proteína em uma planta de milho. Um constructo de DNA compreendendo uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, e 17 onde a molécula de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo de asparagina sintetase ou polipeptídeo tendo atividade de asparagina sintetase, também é incluída.

Em uma modalidade, a presente invenção compreende uma célula de planta de milho transformada com a composição de DNA heterólogo que codifica uma asparagina sintetase identificada como SEQ ID NO: 4. Mais especificamente, a expressão da molécula de polinucleotídeo de AsnS2 de milho heterólogo (isozima 2 de asparagina sintetase) na planta de milho transgênica resulta em um nível elevado de asparagina e proteína na planta transgênica, por exemplo, nas sementes da planta de milho comparadas a uma planta de milho da mesma variedade que não expressa a molécula de polinucleotídeo de AsnS2 de milho heterólogo.

A presente invenção também refere-se ao alimento de animal que compreende a semente acima mencionada com conteúdo de aminoácido ou proteína aumentado, ou um produto processado de tal semente, por exemplo, uma farinha. Conseqüentemente, a presente invenção também abrange uma semente de milho que contém uma enzima de asparagina sintetase produzida por expressão de um constructo de DNA heterólogo compreendendo uma molécula de DNA que codifica uma enzima de asparagina sintetase de milho. Uma modalidade de tal semente é grão colhido, a presente invenção também abrange farinha, glúten e outros produtos de milho feitos de tal grão.

A presente invenção inclui seqüências iniciadoras de ácido nucleico que compreendem uma ou mais das SEQ ID NOs 18-45, ou o complemento disto. A presente invenção inclui um método para detectar ou identificar, no genoma de uma planta transformada ou progênie desta, uma mo-

lécula de polinucleotídeo heteróloga que codifica um polipeptídeo de AsnS de planta, ou um polipeptídeo de planta que tem atividade de AsnS da presente invenção, compreendendo uma molécula de polinucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 18-45, onde a referida molécula de polinucleotídeo é empregada como um iniciador de DNA em um método de amplificação de DNA.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1 ilustra o mapa de plasmídeo de pMON79706.

FIG. 2 ilustra o mapa de plasmídeo de pMON66229.

10 FIG. 3 ilustra o mapa de plasmídeo de pMON66230.

FIG. 4 ilustra o mapa de plasmídeo de pMON66231.

FIG. 5 ilustra o mapa de plasmídeo de pMON66239.

FIG. 6 é a expressão de transgene em eventos de pMON79706.

15 As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança, com n=5 para eventos transgênicos e n=10 para controle congênito.

FIG. 7 é a expressão de transgene em eventos de pMON92870.

As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança, com n>3 de plantas para eventos transgênicos e n=8 de planta para controle congênito.

DESCRIÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO E SEQUÊNCIAS DE POLIPEPTÍDEO

20 SEQ ID NO: 1 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS1 de *Zea mays*.

SEQ ID NO: 2 é um polipeptídeo de AsnS1 de *Zea mays*.

SEQ ID NO: 3 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS1 de *Zea mays*.

25 SEQ ID NO: 4 é um polipeptídeo de AsnS2 de *Zea mays*.

SEQ ID NO: 5 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS3 de *Zea mays*.

SEQ ID NO: 6 é um polipeptídeo de AsnS3 de *Zea mays*.

30 SEQ ID NO: 7 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Glycine max*

SEQ ID NO: 8 é um polipeptídeo de AsnS de *Glycine max*.

SEQ ID NO: 9 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica

um AsnS de *Xylella fastidiosa*.

SEQ ID NO: 10 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Xanthomonas campestris*.

5 SEQ ID NO: 11 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Bacilo halodurans*.

SEQ ID NO: 12 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Oryza sativa*.

SEQ ID NO: 13 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Galdieria sulphuraria*.

10 SEQ ID NO: 14 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Galdieria sulphuraria*.

SEQ ID NO: 15 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Galdieria sulphuraria*.

15 SEQ ID NO: 16 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS de *Galdieria sulphuraria*.

SEQ ID NO: 17 é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um AsnS CGPG3913 de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 18 é uma seqüência iniciadora de PCR de AsnS (f) dianteira.

20 SEQ ID NO: 19 é uma seqüência iniciadora de PCR de AsnS (f) dianteira.

SEQ ID NOs 20-43, são seqüências iniciadoras de PCR de AsnS ® reversas e (f) dianteiras primárias e secundárias empregadas em um procedimento de clonagem Gateway.

25 SEQ ID NO: 44, uma seqüência iniciadora de PCR de AsnS (f) dianteira.

SEQ ID NO: 45, uma seqüência iniciadora de PCR de AsnS (f) dianteira.

30 SEQ ID NO:46 iniciador de ZmAS de sentido.

SEQ ID NO:47 iniciador de ZmAS de anti-sentido.

SEQ ID NO: 48 iniciador dianteiro AsnS3 de milho.

SEQ ID NO: 49 iniciador reverso de AsnS3 de milho.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O seguinte é uma descrição detalhada da invenção fornecida para ajudar aqueles versados na técnica na prática da presente invenção. A menos que de outro modo definido aqui, os termos devem ser considerados de acordo com uso convencional por aqueles de experiência ordinária na técnica relevante. As definições de termos comuns em biologia molecular também podem ser encontradas em Rieger e outros, 1991; e Lewin, 1994. A nomenclatura para bases de DNA apresentadas em 37 CFR § 1.822 é empregada. A nomenclatura de uma e três letras padrão para resíduos de aminoácido é empregada. As modificações e variações nas modalidades descritas aqui podem ser feitas por aqueles de experiência ordinária na técnica sem afastar-se do espírito ou escopo da presente invenção.

A presente invenção fornece um método para aumentar o conteúdo de proteína em uma planta de milho introduzindo-se no genoma de uma célula de planta de milho um polinucleotídeo heterólogo que expresse um polipeptídeo de AsnS na célula de planta transgênica. A presente invenção fornece constructos de DNA que compreendem (compreende significa "incluindo, porém não limitado a") moléculas de polinucleotídeo, ou segmentos de uma molécula de polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo de AsnS, opcionalmente operavelmente ligados a um peptídeo de trânsito de cloroplasto.

As moléculas de polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo de AsnS ou análogo ou alelo deste, ou moléculas de polinucleotídeo que codificam um peptídeo de trânsito ou gene marcador/repórter são "isoladas" pelo fato de que elas foram pelo menos parcialmente preparadas *in vitro*, por exemplo, isoladas de seu estado nativo, de uma célula, purificada, e amplificada, por exemplo, elas estão em combinação com elementos genéticos heterólogos àqueles encontrados normalmente associados com eles em seu estado nativo. Como empregado aqui, um constructo de DNA heterólogo compreendendo uma molécula de polinucleotídeo codificando AsnS que foi introduzida em uma célula hospedeira, não é preferivelmente idêntica a qualquer molécula de polinucleotídeo presente na célula em seu estado nati-

vo, não transformado e é isolada quanto às outras moléculas de DNA que ocorrem no genome da célula hospedeira.

Como empregado aqui, níveis "alterados ou aumentados" de asparagina em uma planta, tecido de planta, ou célula de planta transformada, são os níveis que são maiores do que os níveis encontrados na planta, tecido de planta, ou células de planta correspondentes que não contêm o constructo de DNA da presente invenção.

Os agentes da presente invenção também podem ser recombinantes. Como empregado aqui, o termo recombinante significa qualquer agente (por exemplo, DNA, peptídeo, etc.), isto é, ou resulta, entretanto indiretamente, de manipulação humana de uma molécula de polinucleotídeo.

Como empregado aqui em um aspecto preferido, um aumento na qualidade nutricional de uma semente, por exemplo, conteúdo de proteína de semente aumentado, é determinado pela capacidade de uma planta de produzir uma semente que tenha uma produção mais elevada de proteína ou um componente nutricional do que uma semente sem tal aumento na qualidade de proteína ou nutricional. Em um aspecto particularmente preferido da presente invenção, o aumento na qualidade nutricional é medido relativo a uma planta com uma base genética similar à planta nutricionalmente realçada exceto que a planta da presente invenção expresse ou superexpresse uma proteína ou fragmento desta descrito nos constructos de DNA heterólogo aqui.

Moléculas de Polinucleotídeo

A presente invenção inclui e fornece sementes e plantas de milho transgênicas que compreendem em seu genoma um transgene que compreende uma molécula de DNA heteróloga que codifica uma enzima de asparagina sintetase de milho (Zm.AsnS2), a molécula de DNA, por exemplo, que compreende SEQ ID NO: 3 e seqüências que têm pelo menos 90%, 95%, ou 99% de identidade com tais seqüências com atividade de asparagina sintetase funcional.

Um outro aspecto da invenção é um método para aumentar a proteína em uma planta de milho introduzindo-se em uma célula de milho um

constructo de DNA que fornece uma molécula de polinucleotídeo heteróloga, por exemplo, SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 que codificam uma enzima de asparagina sintetase. O polinucleotídeo pode diferir de quaisquer daqueles exemplos sem alterar o polipeptídeo para o qual codifica. Por exemplo, é compreendido que os códons capazes de codificar para tais substituições de aminoácido conservadoras são conhecidos na técnica. Adicionalmente, a invenção contempla que os polipeptídeos em que um ou mais aminoácidos foram deletados, substituídos, ou adicionados sem alterar a função de asparagina sintetase, podem ser empregados na invenção.

Em um aspecto da presente invenção, o polinucleotídeo da presente invenção é referido ser moléculas de polinucleotídeo introduzidas. Uma molécula de polinucleotídeo é dita ser "introduzida" se for inserida em uma célula ou organismo como um resultado de manipulação humana, de qualquer forma indireta. Os exemplos de moléculas de polinucleotídeo introduzidas incluem, sem limitação, polinucleotídeos que foram introduzidos em células por transformação, transfecção, injeção, e projeção, e aquelas que foram introduzidas em um organismo por conjugação, endocitose, fagocitose, etc. Preferivelmente, o polinucleotídeo é inserido no genoma da célula.

Um subgrupo das moléculas de polinucleotídeo da presente invenção são as moléculas de polinucleotídeo de fragmento. As moléculas de polinucleotídeo de fragmento podem consistir em porção(s) significativa de, ou realmente a maioria das moléculas de polinucleotídeo da presente invenção, tal como aquelas especificamente descritas. Alternativamente, os fragmentos podem compreender oligonucleotídeos menores (tendo de cerca de 15 a cerca de 400 resíduos de nucleotídeo e mais preferivelmente, cerca de 15 a cerca de 30 resíduos de nucleotídeo, ou cerca de 50 a cerca de 100 resíduos de nucleotídeo, ou cerca de 100 a cerca de 200 resíduos de nucleotídeo, ou cerca de 200 a cerca de 400 resíduos de nucleotídeo, ou cerca de 275 a cerca de 350 resíduos de nucleotídeo). Um fragmento de uma ou mais das moléculas de polinucleotídeo da presente invenção pode ser uma sonda e especificamente uma molécula iniciadora de PCR. Um iniciador de PCR é

uma molécula de polinucleotídeo capaz de iniciar uma atividade de polimerase ao mesmo tempo em que em uma estrutura de filamento duplo com outro polinucleotídeo. Vários métodos por determinar a estrutura de sondas de PCR e técnicas de PCR existem na técnica.

5 Como empregado aqui, duas moléculas de polinucleotídeo são ditas ser capazes de especificamente hibridizar a uma outra se as duas moléculas são capazes de formar uma estrutura de polinucleotídeo antiparalela, de filamento duplo.

 Uma molécula de polinucleotídeo é dita ser o "complemento" de
10 outra molécula de polinucleotídeo se elas exibem complementaridade completa. Como empregado aqui, as moléculas são ditas exibir "complementaridade completa" quando todo nucleotídeo de uma das moléculas é complementar a um nucleotídeo da outra. Duas moléculas são ditas ser "minimamente complementar" se eles podem hibridizar com uma outra com estabilidade
15 suficiente para permitir que elas permaneçam aneladas a uma outra sob condições de "baixa-severidade" pelo menos convencionais. Similarmente, as moléculas são ditas serem "complementares" se elas podem hibridizar com uma outra com estabilidade suficiente para permitir que elas permaneçam aneladas a uma outra sob condições de "alta-severidade" convencionais. As condições convencionais de severidade são descritas por
20 Sambrook e outros, (2001), e por Haymes e outros, (1985). As retiradas de complementaridade completa são então permissíveis, contanto que tais retiradas não impeçam completamente a capacidade das moléculas de formar uma estrutura de filamento duplo. Desse modo, para uma molécula de polinucleotídeo servir como um iniciador ou sonda ela precisa somente ser suficientemente complementar em seqüência para ser capaz de formar uma
25 estrutura de filamento duplo estável sob o solvente particular e concentrações de sal empregadas.

 As condições de severidade apropriadas que promovem a hibridação de DNA são, por exemplo, 6,0 X de cloreto de sódio/ citrato de sódio
30 (SSC) a cerca de 45°C, seguido por uma lavagem de 2,0 X de SSC a 20 25°C, são conhecidas por aqueles versados na técnica ou podem ser encon-

tradas em Ausubel, e outros, eds. (1989), seção 6.3.1 6.3.6. Por exemplo, a concentração de sal na etapa de lavagem pode ser selecionada de uma baixa severidade de cerca de 2,0 X de SSC a 50°C a uma severidade elevada de cerca de 0,2 X de SSC a 65°C. Além disso, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de condições de severidade baixa a temperatura ambiente, cerca de 22°C, a condições de severidade elevadas a cerca de 65°C. Tanto a temperatura quanto o sal podem ser variados, ou a temperatura ou a concentração de sal pode ser mantida constante tal que um ácido nucléico especificamente hibridize com uma ou mais das moléculas de polinucleotídeo fornecidas aqui, por exemplo, como apresentado nas: SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18-45 e complementos destas, sob condições moderadamente severas, por exemplo em cerca de 2,0 X de SSC e cerca de 65°C.

Em uma modalidade de um método da presente invenção, quaisquer das seqüências de polinucleotídeo ou seqüências de polipeptídeo, ou fragmentos de qualquer uma das duas, da presente invenção podem ser empregadas para pesquisar quanto às seqüências relacionadas. Como empregado aqui, "pesquisa quanto às seqüências relacionadas" significa qualquer método para determinar a relação entre duas seqüências, incluindo, porém não limitado a, pesquisas que comparam a homologia de seqüência: por exemplo, uma pesquisa de PBLAST de um banco de dados para relação com uma única seqüência de polipeptídeo. Outras pesquisas podem ser conduzidas empregando métodos com base no perfil, tal como o HMM (modelo Hidden Markov) META-MEME, que é mantido por South Dakota State University, SD, e PSI-BLAST que são mantidas pelo Centro Nacional para Informação de Biotecnologia, Biblioteca Nacional de Medicina, Institutos Nacionais de Saúde (NCBI).

Uma molécula de polinucleotídeo pode codificar para uma molécula de polipeptídeo substancialmente idêntica ou substancialmente homóloga. O grau de identidade ou homologia pode ser determinado por uso de software de computador tal como o Programa de Abertura WISCONSIN PACKAGE. O programa de Abertura na versão 10.0-UNIX de WISCONSIN

PACOTE de Genetics Computer Group, Inc. é com base no método de Needleman e Wunsch, 1970. Usando o programa TBLASTN no conjunto de software BLAST 2.2.1 (Altschul e outros, 1997, ou empregando matriz BLOSUM62 (Henikoff e Henikoff, 1992). Uma molécula de polinucleotídeo da presente invenção também pode codificar um polipeptídeo homólogo. Como empregado aqui, uma molécula de polipeptídeo homóloga ou fragmento desta é uma molécula de proteína de contraparte ou fragmento desta ou em uma segunda espécie (por exemplo, subunidade pequena de *rubisco* de milho é um homólogo da subunidade pequena de *rubisco* de *Arabidopsis*). Um homólogo também pode ser gerado por evolução molecular ou técnicas embaralhamento de DNA, de forma que a molécula retenha pelo menos uma característica de estrutura ou funcional do polipeptídeo original (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos 5.811.238).

Em uma modalidade preferida, quaisquer das moléculas de polinucleotídeo da presente invenção podem ser operavelmente unidas a uma região promotora que funciona em uma célula de planta para causar a produção de uma molécula de mRNA, onde a molécula de polinucleotídeo que é unida ao promotor é heteróloga com respeito àquele promotor. Como empregado aqui, DNA "heterólogo" é qualquer seqüência de DNA que não é naturalmente encontrada próximo ao DNA adjacente. "Nativo" se refere a uma seqüência de ácido nucléico de ocorrência natural. Seqüência "heteróloga" geralmente se origina de uma fonte estrangeira ou espécies ou, se da mesma fonte, é modificada de sua forma original e/ou local no genoma.

Como empregado aqui, os termos "proteína", "molécula de peptídeo", ou "polipeptídeo" incluem qualquer molécula que compreenda cinco ou mais aminoácidos. Sabe-se na técnica que a proteína, peptídeo, ou moléculas de polipeptídeo podem sofrer modificação, incluindo modificações pós-translacionais, tal como, porém não limitado a, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, fosforilação ou oligomerização. Desse modo, como empregado aqui, os termos "proteína", "molécula de peptídeo" ou "polipeptídeo" incluem qualquer proteína que seja modificada por qualquer processo biológico ou não biológico. Os termos "aminoácido" e "aminoácidos" se refe-

rem a todos os L-aminoácidos de ocorrência natural. Esta definição é significada incluir norleucina, norvalina, ornitina, homocisteína, e homoserina.

Um "fragmento de proteína" é uma molécula de polipeptídeo ou peptídeo cuja seqüência de aminoácido compreende um subgrupo da seqüência de aminoácido daquela proteína. Uma proteína ou fragmento desta
5 que compreende uma ou mais regiões de peptídeo adicionais não derivadas daquela proteína é uma proteína de "fusão". Tais moléculas podem ser derivadas para conter carboidrato ou outras porções (tal como hemocianina de lapa de buraco da fechadura). A proteína de fusão ou moléculas de peptídeo
10 da presente invenção são preferivelmente produzidas por meios recombinantes.

Constructos de Planta e Transformantes de Planta

Uma ou mais dos constructos de DNA da presente invenção que codificam para um asparagina sintetase podem ser empregadas na trans-
15 formação ou transfecção de planta. O material genético exógeno pode ser transferido em uma célula de planta e a célula de planta regenerada em uma planta inteira, fértil, ou estéril. O material genético exógeno é qualquer material genético, quer de ocorrência natural ou de outro modo, de qualquer fonte que seja capaz de ser inserida em qualquer organismo.

20 Em um outro aspecto da presente invenção, as seqüências de polinucleotídeo da presente invenção também codificam os peptídeos envolvidos na localização, exportação, ou modificação pós-translacional intracelular, por exemplo, os peptídeos de trânsito de cloroplasto.

Como usado nisto, o termo "gene" inclui uma molécula de ácido
25 nucléico que fornece a regulação da transcrição que inclui um promotor que funciona em plantas, moléculas 5' não transladadas, por exemplo, íntrons e seqüências líderes, uma molécula de ácido nucléico transcrito e uma molécula de terminação transcricional 3'.

30 As moléculas de ácido polinucleico que codificam um polipeptídeo da presente invenção podem ser combinadas com outras seqüências heterólogas ou não nativas em uma variedade de modos. Por seqüências "heterólogas" é entendida qualquer seqüência que não seja naturalmente

encontrada unida à seqüência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo da presente invenção, incluindo, por exemplo, combinações de seqüências de nucleotídeo da mesma planta que não são naturalmente encontradas juntas, ou as duas seqüências originam de duas espécies diferentes. O termo "operavelmente unidas", como empregado em referência à disposição da função e física de moléculas de polinucleotídeo reguladoras e estruturais que tornam a expressão regulada de uma molécula de polinucleotídeo estrutural operavelmente ligada.

A expressão de um constructo de DNA ou transgene significa a transcrição e acumulação estável de RNA de sentido ou anti-sentido ou proteína derivada da molécula de polinucleotídeo da presente invenção ou translação desta. RNA de "sentido" significa transcrição de RNA que inclui o mRNA e assim pode ser transladado em polipeptídeo ou proteína pela cela. "RNA de anti-sentido" significa uma transcrição de RNA que é complementar a toda ou parte de uma transcrição primária alvo ou mRNA e que bloqueia a expressão de um gene alvo (Patente dos Estados Unidos 5.107.065, incorporada aqui por referência). A complementaridade de um RNA de anti-sentido pode ser com qualquer parte da transcrição de gene específica, isto é, na seqüência de não codificação 5', seqüência não transladada 3', introns, ou a seqüência de codificação. "Transcrição de RNA" significa o produto resultante de transcrição catalisada por RNA polimerase de uma seqüência de DNA. Quando a transcrição de RNA é uma cópia complementar perfeita da seqüência de DNA, ela é referida como a transcrição primária ou pode ser uma seqüência de RNA derivada de processamento pós-transcricional da transcrição primária e é referido como o RNA maduro.

Como empregado aqui, o termo cassetes de expressão de planta se refere a um constructo compreendendo as moléculas reguladoras de DNA necessárias operavelmente unidas à molécula alvo para fornecer expressão em uma célula de planta.

O constructo de DNA da presente invenção pode, em uma modalidade, conter um promotor que causa a superexpressão do polipeptídeo da presente invenção onde "superexpressão" significa a expressão de um

polipeptídeo ou não normalmente presente na célula hospedeira, ou presente na referida célula hospedeira a um nível mais elevado do que aquele normalmente expressado do gene endógeno codificando o referido polipeptídeo. Os promotores que podem causar a superexpressão do polipeptídeo da presente invenção são geralmente conhecidos na técnica, os exemplos de
5 tais que fornecem padrão de expressão constitutiva incluem promotor de vírus 19S mosaico de couve-flor e promotor de vírus 35S mosaico de couve-flor (Patente dos Estados Unidos nº 5.352.605), promotor de vírus 35S mosaico de escrofulária (Patente dos Estados Unidos nº 6.051.753), promotor
10 de vírus em forma de bacilo de cana-de-açúcar (Patente dos Estados Unidos nº 5.994.123), promotor de vírus de commelina yellow mottle (Medberry e outros, 1992), subunidade pequena de promotor de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase, promotor de triosefosfato citosólico isomerase de arroz, promotor de fosforibosiltransferase de adenina, promotor de actina 1 de arroz (Pa-
15 tente dos Estados Unidos 5.641.876), promotor de ubiquitina de milho, promotor de manopina sintase e promotor de octopina sintase.

Tais constructos genéticos podem ser transferidos em plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas incluindo, porém não limitado a alfafa, maçã, *Arabidopsis*, banana, *Brassica campestris*, óleo de colza, feijão de
20 rícino, café, milho, algodão, caroço de algodão, crisântemo, *crambe*, pepino, *Dendrobium spp*, *Dioscorea spp.*, eucalipto, festuca, linho, gladiolo, liliacea, linhaça, milho miúdo, melão almiscarado, mostarda, aveia, dendezeiro, óleo de semente de colza, amendoim, azevém perene, *Phaseolus*, semente de colza, arroz, sorgo, feijão-soja, centeio, *tritordeum*, *turfgrass*, trigo, açafroa,
25 gergelim, beterraba-doce, cana-de-açúcar, oxicoco, mamão, cártamo, e girassol (Christou, 1996). Em uma modalidade preferida, o material genético é transferido em uma célula de milho.

A transferência de uma molécula de polinucleotídeo que codifica uma proteína pode resultar na expressão ou superexpressão daquele polipeptídeo em uma célula transformada ou planta transgênica. Uma ou mais
30 das proteínas ou fragmentos destas codificadas por moléculas de polinucleotídeo da presente invenção podem ser superexpressadas em uma célula

transformada ou planta transformada.

Em uma modalidade, os constructos de DNA da presente invenção incluem uma molécula de polinucleotídeo que codifica uma seqüência de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17. A invenção fornece células de milho transformadas onde, relativo a uma planta de milho não transformada sem tal constructo de DNA, a célula tem um nível de asparagina realçado.

Em outra modalidade, os constructos de DNA da presente invenção incluem uma molécula de DNA heteróloga operavelmente unida a uma asparagina sintetase de milho que codifica a seqüência, por exemplo, SEQ ID NOs 1, 3, ou 5, e o constructo de DNA é transformado em célula de milho. Em uma modalidade preferida, os constructos de DNA da presente invenção compreendendo SEQ ID NO: 3 são fornecidas em uma célula de milho transformada, e a expressão do constructo de DNA fornece um tecido de planta de milho com asparagina aumentada ou uma semente de planta de milho com proteína aumentada relativo a uma planta de milho não transformada com o constructo de DNA.

Em algumas modalidades, os níveis de um ou mais produtos do AsnS podem ser aumentados em toda uma planta ou podem ser localizados em um ou mais órgãos ou tecidos da planta específicos. Sem limitar o escopo da presente invenção, várias seqüências promotoras são úteis para expressar o gene da enzima acima. Por exemplo, milho C4 tipo promotor de PPDK (Glackin e outros, 1990), milho C4 tipo promotor de PEPC (Hudspeth e Grula, 1989), promotor de subunidade pequena de arroz Rubisco (Kyozuka e outros, 1993), e promotor de proteína de ligação a/b de clorofila de colheita em luz (Sakamoto e outros, 1991), o promotor de P-FDA (US20040216189A1, a seqüência de polinucleotídeo da qual está aqui incorporada por referência), e promotor de P-RTBV (Patente dos Estados Unidos 5.824.857, a seqüência de polinucleotídeo da qual está aqui incorporada por referência). Por exemplo, os níveis de asparagina ou proteína podem ser aumentados em um ou mais dos tecidos e órgãos de uma planta que inclui sem limitação: raízes, tubérculos, talos, folhas, talos, fruta, bagas, nozes,

cascas, casulos, sementes, e flores. Um órgão preferido é uma semente.

Com o propósito de expressão em tecidos de fonte da planta, tal como a folha, semente, raiz, ou talo, é preferido que os promotores utilizados tenham expressão relativamente elevada nestes tecidos específicos. Expressão específica de tecido de uma proteína da presente invenção é uma
5 modalidade particularmente preferida.

Os constructos de DNA ou vetores também podem incluir, com a região de codificação de interesse, uma seqüência de polinucleotídeo que atua, em todo ou em parte, para terminar a transcrição daquela região. Várias tais seqüências foram isoladas, incluindo a região T-NOS 3' (Ingelbrecht
10 e outros, 1989; Bevan e outros, 1983). As regiões de terminação de transcrição reguladora podem ser fornecidas em constructos de expressão de planta desta presente invenção também. As regiões de terminação de transcrição podem ser fornecidas pela seqüência de DNA que codifica o gene de
15 interesse ou uma região de terminação de transcrição conveniente derivada de uma fonte de gene diferente, por exemplo, a região de terminação de transcrição que é naturalmente associada com a região de iniciação de transcrição. O técnico versado reconhecerá que qualquer região de terminação de transcrição conveniente que é capaz de terminar a transcrição em
20 uma célula de planta pode ser empregada nos constructos da presente invenção.

Um vetor ou constructo também pode incluir elementos reguladores, tal como íntrons. Os exemplos de tais incluem, o íntron 1 Adh (Callis e outros, 1987), o íntron de sacarose sintase (Vasil e outros, 1989), intron de
25 hsp70 (Patente dos Estados Unidos 5.859.347), e o elemento de ômega TMV (Gallie e outros, 1989). Estes e outros elementos reguladores podem ser incluídos quando apropriado.

Um vetor ou constructo também pode incluir um marcador selecionável. Os marcadores selecionáveis também podem ser empregados para
30 selecionar quanto às plantas ou células de planta que contêm o material genético exógeno. Os exemplos de tais incluem, porém não estão limitados: um gene *neo* (Potrykus e outros, 1985), que codifica para resistência de ca-

namicina e pode ser selecionado por empregar canamicina, nptII, G418, hpt, etc.; um gene de barra, que codifica para resistência de bialafos; um gene de EPSP sintase mutante (Hinchee e outros, 1988; Reynaerts e outros, 1988; Jones e outros, 1987) que codifica resistência de glifosato; um gene de nitrilase que confere resistência à bromoxinila (Stalker e outros, 1988); um gene de acetolactato sintase mutante (ALS) que confere resistência à imidazolinona ou sulfoniluréia (Patente dos Estados Unidos 4.761.373); D'Halluin e outros, 1992); e um gene DHFR resistente a metotrexato (Thillet e outros, 1988).

10 Transformação de Planta

Os métodos mais geralmente empregados para transformação de células de planta é o processo de transferência de DNA mediado por *Agrobacterium* e o processo mediado por bombardeio biolístico ou de microprojétil (isto é, pistola de gene). Tipicamente, a transformação nuclear é desejada, porém se é desejável especificamente transformar os plastídeos, tal como cloroplastos ou amiloplastos, os plastídeos de planta podem ser transformados utilizando uma liberação mediada por microprojétil do polinucleotídeo desejado.

Os métodos para introduzir transgenes em plantas por transformação mediada por *Agrobacterium* utilizam um T-DNA (DNA de transferência) que incorpora os elementos genéticos do transgene e transfere esses elementos genéticos no genoma de uma planta. Geralmente, o transgene(s) limitado por uma molécula de DNA de borda direita (RB) e uma molécula de DNA de borda esquerda (LB) é transferido no genoma de planta em um único lugar. A "molécula de T-DNA" se refere a uma molécula de DNA que interage em um genoma de planta por um método de transformação mediado por *Agrobacterium*. As extremidades da molécula de T-DNA são definidas na presente invenção como sendo flanqueadas pelas regiões de borda do T-DNA de plasmídeos de Ti de *Agrobacterium*. Estas regiões de borda geralmente são referidas como as regiões de borda Direita (RB) e borda Esquerda (LB) e existem como variações em seqüência de nucleotídeo e o comprimento dependendo se elas são derivadas de filamentos de produção de no-

palina ou octopina de *Agrobacterium*. As regiões de borda geralmente empregadas em constructos de DNA designadas para transferir transgenes em plantas são freqüentemente várias centenas de polinucleotídeos em comprimento e compreendem um sítio de corte onde uma endonuclease digere o DNA para fornecer um sítio para inserção no genoma de uma planta. As moléculas de T-DNA geralmente contêm um ou mais cassetes de expressão de planta.

Com respeito ao bombardeio de microprojétil (Patentes dos Estados Unidos 5.550.318; 5.538.880; e 5.610.042; cada das quais especificamente está aqui incorporada por referência em sua totalidade), as partículas são revestidas com polinucleotídeos e liberadas em células por uma força propelente. As partículas exemplares incluem aquelas compreendidas de tungstênio, platina, e preferivelmente, ouro. Um método útil para liberar DNA em células de planta por aceleração de partícula é o Sistema de Liberação de Partícula Biolístico (BioRad, Hercules, Califórnia), que pode ser empregado para propelir as partículas revestidas com DNA ou células através de uma tela, tal como uma tela de Nytex ou aço inoxidável, sobre uma superfície de filtro coberta com células de planta monocotiledôneas cultivadas em suspensão. As técnicas de bombardeio de microprojétil são amplamente aplicáveis, e podem ser empregadas para transformar virtualmente qualquer espécie de planta. Os exemplos de espécies que foram transformadas por bombardeio de microprojétil incluem espécies monocotiledôneas tal como milho (Publicação PCT WO 95/06128), cevada, trigo (Patente dos Estados Unidos 5.563.055, incorporada aqui por referência em sua totalidade), arroz, aveia, centeio, cana-de-açúcar, e sorgo; bem como vários dicotilédones incluindo tabaco, soja (Patente dos estados Unidos 5.322.783, incorporada aqui por referência em sua totalidade), girassol, amendoim, algodão, tomate, e legumes em geral (Patente dos estados Unidos 5.563.055, incorporada aqui por referência em sua totalidade).

Para selecionar ou classificar quanto às células de planta transformadas independente da metodologia de transformação, o DNA introduzido na célula contém um gene que funciona em um tecido de planta regene-

rável para produzir um composto que concede no tecido da planta resistência a um composto de outro modo tóxico. Os genes de interesse para uso como um marcador selecionável, avaliável ou classificável incluiriam, porém não se limitariam a GUS, proteína fluorescente verde (GFP), luciferase (LUX), e genes de tolerância antibiótico ou herbicida. Os exemplos de genes de resistência antibiótica incluem aqueles concedendo resistência a canamicina (e neomicina, G418), e bleomicina.

A regeneração, desenvolvimento, e cultivo de plantas de vários explantes transformados são bem documentados na técnica. Esta regeneração e processo de crescimento tipicamente incluem as etapas de selecionar as células transformadas e cultivar aquelas células individualizadas através dos estágios usuais de desenvolvimento embrionário através do estágio de plantinha arraigada. As sementes e embriões transgênicos similarmente regenerados. Os brotos arraigados transgênicos resultantes são plantados depois disso em um meio de crescimento de planta apropriado tal como terra. As células que sobrevivem à exposição ao agente seletivo, ou células que foram classificadas positivas em um ensaio de avaliação, podem ser cultivadas em meios que suportam a regeneração de plantas. As platinhas em desenvolvimento são transferidas para mistura de crescimento de planta com menos terra, e endurecidas, antes da transferência para uma estufa ou câmara de crescimento para maturação.

A presente invenção pode ser empregada com qualquer célula ou tecido transformável. Por transformável como empregado aqui é significada uma célula ou tecido que seja capaz de outra propagação para dar origem a uma planta. Aqueles de experiência na técnica reconhecem que várias células ou tecidos de planta são transformáveis nos quais após a inserção de DNA exógeno e condições de cultura apropriadas, as células ou tecidos de planta podem se formar em uma planta diferenciada. O tecido adequado para estes propósitos pode incluir, porém não está limitado a embriões imaturos, tecido *scutellar*, culturas de célula em suspensão, inflorescência imatura, meristem de disparo, explantes nodais, tecido de calo, tecido de hipocotilédone, cotilédones, raízes, e folhas.

Qualquer meio de cultura de planta adequado pode ser empregado. Os exemplos de meios adequados incluiriam, porém não estão limitados a meios com base em MS (Murashige e Skoog, 1962) ou meios com base em N6 (Chu e outros, 18:659, 1975) suplementados com reguladores de crescimento de planta adicionais que incluem, porém não limitados a auxinas, citocininas, ABA, e giberelinas. Aqueles de experiência na técnica estão familiarizados com a variedade de meios de cultura de tecido, que quando suplementado adequadamente, suportam o crescimento e desenvolvimento de tecido de planta e são adequados para transformação e regeneração de planta. Estes meios de cultura de tecido podem ser comprados como uma preparação comercial, ou preparados e modificados como costume. Aqueles de experiência na técnica estão atentos que os meios e suplementos tal como nutrientes e reguladores de crescimento para uso na transformação e regeneração e outras condições de cultura tal como intensidade de luz durante a incubação, pH, e temperaturas de incubação que podem ser otimizados para a variedade particular de interesse.

Quaisquer das moléculas de polinucleotídeo da presente invenção podem ser introduzidas em uma célula de planta de uma maneira permanente ou transitória em combinação com outros elementos genéticos tal como vetores, promotores, realçadores, etc. Além disso, quaisquer das moléculas de polinucleotídeo da presente invenção podem ser introduzidas em uma célula de planta de uma maneira que isso permita a expressão ou superexpressão da proteína ou fragmento desta codificados pela molécula de polinucleotídeo.

A presente invenção também fornece partes das plantas, particularmente partes reprodutivas ou de armazenamento, da presente invenção. As partes de planta, sem limitação, incluem semente, endosperma, óvulo, pólen, ou tubérculos. Em uma modalidade particularmente preferida da presente invenção, a parte de planta é uma semente de milho. Em uma modalidade a semente de milho (ou grão) é um componente de alimento animal.

Em uma modalidade preferida, o alimento de milho ou farinha de

milho ou proteína da semente de milho é designado para animais de gado ou seres humanos, ou ambos. Os métodos para produzir alimento, farinha e proteína, são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos 4.957.748; 5.100.679; 5.219.596; 5.936.069; 6.005.076; 5 6.146.669; e 6.156.227. Em uma modalidade preferida, a preparação de proteína é uma preparação de alto teor de proteína. Tal preparação de alto teor de proteína preferivelmente tem um conteúdo de proteína maior do que cerca de 5% (peso/volume), mais preferivelmente 10% (peso/volume), e até mesmo mais preferivelmente 15% (peso/volume).

10 As descrições de métodos de reprodução que são geralmente empregadas para colheitas e características diferentes podem ser encontradas em um dos vários livros de referência (por exemplo, Hayward, 1993; Richards, 1997; Allard, 1999).

Outros Organismos

15 Um polinucleotídeo da presente invenção pode ser introduzido em qualquer célula ou organismo tal como uma célula de mamífero, mamífero, célula de peixe, peixe, célula de pássaro, pássaro, célula de algas, algas, célula de fungos, fungos, ou células bacterianas. Uma proteína da presente invenção pode ser produzida em uma célula ou organismo apropriado. Os 20 hospedeiros e transformantes preferidos incluem: células de fungos tal como *Aspergillus*, leveduras, mamíferos, particularmente bovina e porcina, insetos, bactérias, e algas. As bactérias particularmente preferidas são *Agrobacterium tumefaciens* e *E. coli*.

25 Em um aspecto da presente invenção, uma ou mais das moléculas de ácido nucléico da presente invenção são empregadas para determinar o nível de expressão (isto é, a concentração de mRNA em uma amostra, etc.) em uma planta (preferivelmente óleo de colza, milho, *Brassica campestris*, óleo de semente de colza, semente de colza, soja, *crambe*, mostarda, feijão de rícino, amendoim, gergelim, caroço de algodão, linhaça, açafroa, 30 dendezeiro, linho ou girassol) ou padrão (isto é, os cinéticos de expressão, taxa de decomposição, perfil de estabilidade, etc.) da expressão de uma proteína codificada em parte ou inteira por uma ou mais das moléculas de poli-

nucleotídeo da presente invenção. Vários métodos podem ser empregados para comparar a expressão entre duas ou mais amostras de células ou tecido. Estes métodos incluem ensaios de hibridação, tal como, ensaios de proteção de RNAase do norte, e hibridação *in situ*. Alternativamente, os métodos incluem ensaios tipo PCR. Em um método preferido, a expressão é avaliada hibridando-se polinucleotídeos das duas ou mais amostras para uma disposição de polinucleotídeos. A disposição contém uma pluralidade de seqüências suspeitadas conhecidas ou suspeitas de estarem presentes em células ou tecidos das amostras.

Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar os aspectos da invenção, aqueles de experiência na técnica devem, levando em conta a presente descrição, apreciar que muitas alterações podem ser feitas nos aspectos específicos que são descritos e ainda obtêm um resultado igual ou semelhante sem afastar-se do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLOS

Aqueles de experiência na técnica apreciarão as muitas vantagens dos métodos e composições fornecidos pela presente invenção. Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar as modalidades preferidas da invenção. Deveria ser apreciado por aqueles de experiência na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representam as técnicas descritas pelos inventores para funcionar bem na prática da invenção, e desse modo podem ser consideradas constituir os modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles de experiência na técnica devem, levando em conta a presente descrição, apreciar que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda obtêm um resultado igual ou similar sem afastar-se do espírito e escopo da invenção. Todas as referências citadas aqui são incorporadas aqui por referência na medida em que elas suplementam, explicam, fornecem um fundamento para, ou ensinam a metodologia, técnicas, ou composições empregadas aqui.

Exemplo 1

Constructo de bibliotecas genômicas e cDNA de planta milho e soja.

Este exemplo descreve a produção de bibliotecas de cDNA fei-

tas de tecidos de planta de milho e soja dos quais as seqüências de AsnS de milho e polinucleotídeo de soja da presente invenção foram isoladas. As bibliotecas de cDNA foram geradas de tecido de *Zea mays* e *Glycine max* empregando técnicas conhecidas na técnica, por exemplo, Alba, 2004. As bibliotecas de cDNA de milho foram feitas de dois tecidos diferentes. Uma biblioteca foi feita de caroços incipientes colhidos na fase demorada de linhagem congênita 90DDD5. Uma segunda biblioteca de cDNA de milho foi feita de tecido de seda no estágio de crescimento de seda de linha congênita de milho H99 e germinação de pólen germinando de linhagem congênita de milho MO17. Para constructo de uma biblioteca de cDNA de soja (*Glycine max*), o tecido meristemático e parte do tecido de hipocotiledônea foram excisados de sementes de soja secas rehidratadas de variedade A3237 (Asgrow). Os explantes foram preparados primeiro germinando-se as sementes esterilizadas na superfície em meios de cultura de tecido de sólido durante 6 dias a 28 °C em 18 horas de luz / dia, e em seguida transferindo as sementes germinadas a 4°C durante pelo menos 24 horas. Para o tecido empregado na preparação de biblioteca os cotiledôneas foram removidos para enriquecer para o tecido específico de interesse. 0,5 a 2 gramas de tecido foram empregados para a preparação de RNA total e poli A+ RNA. Para todas as bibliotecas de cDNA, os tecidos de planta foram colhidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O tecido colhido foi armazenado a -80°C até a preparação de RNA total. O RNA total foi purificado empregando reagente Trizol de Invitrogen Corporation (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, E.U.A.), essencialmente como recomendado pelo fabricante. Poli A+ RNA (mRNA) foi purificado empregando contas de oligo dT magnéticas essencialmente como recomendado pelo fabricante (Dynabeads, Dynal Biotech, Oslo, Noruega).

O constructo de bibliotecas de cDNA de planta é bem conhecida na técnica e várias estratégias de clonagem existem. Vários kits de constructo de biblioteca de cDNA são comercialmente disponíveis. As bibliotecas de cDNA eram preparadas empregando o Sistema de Plasmídeo Superscript® para síntese de cDNA e Clonagem de Plasmídeo (Invitrogen Corporation),

como descrito no protocolo de síntese de biblioteca de cDNA de Sobrescrito II. As bibliotecas de cDNA foram verificadas para confirmar uma relação de inserção:vetor apropriada.

Uma biblioteca de DNA genômico foi construída empregando
5 DNA genômico isolado de *Zea mays* empregando um protocolo de isolamento de DNA genômico modificado descrito abaixo (Dellaporta e outros, 1983). As mudas de milho foram crescidas em solo ou em placas Petri, foram colhidas, e mantidas congeladas em nitrogênio líquido até extração. O tecido foi moído para um pó fino empregando um almofariz e pilão ao mesmo tempo
10 em que mantendo o tecido congelado com nitrogênio líquido. O tecido em pó foi transferido para um liquidificador de Waring que contém 200 mL de tampão de extração de DNA frio (0°C) (350 mM de sorbitol; 100 mM de Tris; 5 mM de EDTA; pH a 7,5 com HCl; bissulfito de sódio, 3,8 mg/mL) que foi adicionado exatamente antes do uso, e homogeneizado em alta velocidade durante 30-60 segundos. O homogeneizado foi filtrado através de uma camada
15 de tecido de algodão e coletado em uma garrafa centrífuga. As amostras foram então centrifugadas a 2500xg durante 20 minutos, e o sobrenadante e qualquer material verde solto, foi descartado. O pélete foi então ressuspense em 1,25 mL de tampão de extração de DNA e transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL. O tampão de lise de núcleos (1,75 mL contendo 200
20 mM de Tris; 50 mM de EDTA; 2 M de NaCl; 2,0% (peso/volume) de CTAB; pH ajustado a 7,5 com HCl) foi então adicionado, seguido por adição de 0,6 mL de 5% (peso/volume) de sarcosila. Os tubos foram suavemente misturados, e as amostras foram incubadas a 65°C durante 20 minutos. Um volume
25 igual de clorofórmio:álcool de isoamila (24:1) foi adicionado e os tubos foram novamente suavemente misturados. Os tubos foram então centrifugados a 2500xg durante 15 minutos, e o sobrenadante resultante foi transferido para um tubo limpo. Um volume igual de isopropanol resfriado em gelo foi derramado sobre a amostra, e a amostra foi invertida várias vezes até que um
30 precipitado se formasse. O precipitado foi removido da solução empregando uma pipeta de vidro e o álcool residual removido permitindo-se o precipitado secar em ar durante 2-5 minutos. O precipitado era ressuspense em 400 µL

de tampão TE (10mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH ajustado para 8,0).

Exemplo 2

Isolamento de seqüências de polinucleotídeo de AsnS por ligação independente e métodos de clonagem de Gateway e transformação de milho.

5 Este exemplo ilustra o isolamento de moléculas de polinucleotídeo que codificam AsnS empregando a ligação independente e métodos de clonagem de Gateway® e a construção de constructos de DNA da presente invenção que compreende as moléculas de polinucleotídeo que codificam os polipeptídeos de AsnS isolados de várias plantas e fontes de microorganismos como descrito na Tabela 1. As moléculas promotoras empregadas para 10 direcionar a expressão das moléculas de polinucleotídeo de codificação de AsnS unidas é o promotor de actina 1 de arroz, P-Os.Act1 (Patente dos Estados Unidos nº 5.641.876, aqui incorporada por referência); o PPKK de *Zea mays* (Matsuoka e outros, 1993), P-RTBV-1 (Patente dos Estados Unidos 15 5.824.857, aqui incorporada por referência), e o P-Zm.NAS (molécula promotora da região genômica que codifica para um polipeptídeo de nicotianamina sintase 2 de milho).

Tabela 1. Fonte de seqüência de codificação de AsnS, promotor e constructos de DNA

SEQ ID NO:	Fonte de seqüência de codificação	Promotor	Constructo de DNA exemplar
3	AsnS1 de <i>Zea mays</i>	P-Os.Act1	pMON79706
5	AsnS3 de <i>Zea mays</i>	P-Os.Act1	pMON92870
7	<i>Glycine Max</i>	P-Os.Act1	pMON79700
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P-Os.Act1	PMON79653

20 A clonagem independente de ligação foi desenvolvida para clonar os produtos de PCR e com base no anelamento de extremidades de filamento único não palindrômicas. LIC é um método de clonagem eficiente, que não está limitado por sítios de restrição ou pela necessidade de reações de ligação ou digestão de enzima de restrição e deixa junções sem costura 25 (Aslanidis e de Jong, 1990).

Os segmentos de DNA de filamento único terminais são produ-

zidos no vetor através do uso de uma "endonuclease de corte" e endonuclease de restrição. Uma endonuclease de corte é uma endonuclease que corta um filamento do dúplex de polinucleotídeo para criar filamentos de filamento único no vetor de clonagem. O vetor é primeiro linearizado com uma endonuclease de restrição padrão. Isto é seguido então por digestão com uma endonuclease de corte. Após tratamento térmico, segmentos de DNA de filamento único terminais são produzidos no vetor. Um conteúdo de GC de aproximadamente 55% é recomendado para amplificação de PCR a jusante e anelamento eficiente. O promotor, rótulo, ou outro elemento de sequência, podem ser adicionados às extremidades de 5' e 3' do produto amplificado por PCR para criar um constructo linear que pode ser empregada em aplicações a jusante.

O pMON92870 de constructo de DNA foi montado do vetor de base, pMON82060, e uma molécula de polinucleotídeo de *AsnS3* de milho que codifica um polipeptídeo de AsnS fornecido como SEQ ID NO 5. O pMON82060 de cadeia principal de plasmídeo foi linearizado empregando a endonuclease de restrição, HpaI. A cadeia principal de plasmídeo foi então tratada com a endonuclease de corte, N.BbvC IA (New England Biolabs, Beverly, MA). Após a digestão, a reação foi aquecida a 65°C. Isto faz com que os filamentos cortados de DNA se desassociem dos seus filamentos de DNA complementares. A cadeia principal de plasmídeo linearizada resultante foi deixada com dois segmentos de DNA de filamento único terminais disponíveis para montagem.

A reação em cadeia de polimerase foi empregada para produzir os segmentos de DNA de filamento único terminais no *AsnS* de codificação de molécula de DNA. A sequência de polinucleotídeo de *AsnS3* de milho (SEQ ID NO: 5) codificando o polipeptídeo de AsnS foi empregada para o design do iniciador de PCR dianteiro (SEQ ID NO: 48) e do iniciador de PCR reverso (SEQ ID NO: 49) :

SEQ ID NO:48: GCAGTCGCTGTCGTTACCCGGCATCATGTGTGGCATC
 SEQ ID NO:49: GCGAGTACCGCTGGGTTCTAACGTACTCTCGTCA-
 GACCGCG

A amplificação de reação em cadeia de polimerase foi realizada

empregando a polimerase térmica de alta fidelidade, a polimerase de DNA de começo quente KOD (Novagen, Madison, WI). A reação em cadeia de polimerase foi realizada em um volume de 25 μ L contendo, 1X de tampão de polimerase de DNA de começo quente de KOD, 1M de betaína (Sigma, St., Louis, MO), 1mM de MgSO₄, 250 μ M de dNTPs, 5 pmols de cada iniciador e 1 unidade de polimerase de DNA de começo quente de KOD. A reação em cadeia de polimerase foi realizada em um circulator térmico PTC-225 DNA Engine Tetrad™ (MJ Researcho Inc., Waltham, MA) empregando os seguintes parâmetros do circulator:

- 10 1. 94°C durante 2 minutos
2. 94°C durante 15 segundos
3. 70°C durante 30 segundos (-1°C por ciclo)
4. 72°C durante 5 minutos
5. Ir para a etapa 2, 9 vezes,
- 15 6. 94°C durante 15 segundos
7. 60°C durante 30 segundos
8. 72°C durante 5 minutos
9. Ir para a etapa 6, 24 vezes,
10. 72°C durante 10 minutos
- 20 11. 10°C mantido
12. fim

Uma segunda rodada de reação em cadeia de polimerase foi realizada para introduzir os resíduos de uridina na região onde os segmentos de DNA de filamento único terminais foram produzidos. Muitas polimerases de DNA são incapazes de ler os resíduos de uridina no filamento modelo de DNA ou são incapazes de polimerizar os filamentos empregando os resíduos de uridina. A reação em cadeia de polimerase foi, portanto realizada empregando uma enzima capaz de incorporar e ler as uridinas (Expand High Fidelity® mais PCR System; Roche, Indianapolis, IN). A modificação deste método e uso de outros métodos que fornecem o resultado esperado é conhecido por aqueles versados na técnica.

O constructo de DNA montado foi transformado em células com-

petentes de *E. coli* DH10B ElectroMAX[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). Uma alíquota de 0,5µL (microlitro) da reação de montagem foi misturada com 20 µL de células competentes DH10B ElectroMAX[®] em gelo e carregada em uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm MicroPulser (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA) para eletroporação. As células foram submetidas a eletroporação em 1,8 kV empregando um Eletroporador 165-2100 MicroPulser (Bio-Rad Laboratories Inc.). As células eletroporadas foram incubadas em 180 µL de meio SOC (Invitrogen Inc.) a 37°C durante 1 hora. As células foram então semeadas em placas ágar LB chapeia contendo espectinomicina (75 mg/L) e desenvolvidas durante a noite a 37°C. As colônias foram selecionadas e crescidas durante a noite em meio LB a 37°C. O constructo de DNA de plasmídeo foi isolado empregando o *kit* QIAprep[®] Spin Miniprep (QIAGEN Science, Valencia, CA). O seqüenciamento de DNA foi realizado em um Analisador de DNA ABI 3730xl, empregando terminador BigDye[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A clonagem de *AsnS2* de milho, *AsnS* de soja, e *AsnS1* de fermento seqüências de polinucleotídeo de codificação de *AsnS* foi concluída empregando o "método de clonagem Gateway[®]" como descrito pelo fabricante (Invitrogen Corp.). O objetivo do método de clonagem Gateway[®] é fazer um clone de expressão. Este processo de duas etapas envolve primeiro, a clonagem do gene de interesse em um vetor de entrada, seguido por subclonagem do gene de interesse do vetor de entrada em um vetor de destino para produzir um vetor de expressão. A tecnologia de clonagem é com base no sistema de recombinação de sítio específico empregado por fago lambda para integrar seu DNA no cromossoma de *E. coli*.

Os constructos de DNA para uso em clonagem de recombinação subsequente, duas seqüências de recombinação de attR ou attB foram clonados em um vetor recombinante que flanqueia um gene de resistência de espectinomicina/Etrepomicina (SPC/STR) e uma seqüência de polinucleotídeo de codificação de *AsnS*. As seqüências de polinucleotídeo de codificação de *AsnS* foram isoladas de bibliotecas genômicas ou de cDNA feitas das suas respectivas espécies empregando as seqüências iniciadoras primárias

e secundárias (SEQ ID NOs 20-43). As seqüências contíguas *attB1/R1*, gene de SPC/STR, gene de *AsnS*, e seqüências de *attB2/R2* foram movidas como uma única molécula de polinucleotídeo a um constructo recombinante para a expressão em células de planta, os plasmídeos de DNA de filamento duplo designados pMON79706 (*AsnS1* de *Zea mays*), pMON79700 (*AsnS* de *Glycine max*) ou pMON79653 (*AsnS* de *Saccharomyces cerevisiae*). Estes constructos de DNA compreendem as regiões da borda direita de *Agrobacterium* (O-OTH. - RB) e regiões da borda esquerda (LB), e outras descritas por Herrera-Estrella e outros, 1983; Bevan, 1984; Klee e outros, 1985, o promotor e35S (P-CAMV.35S, realçador duplicado em série Patente dos Estados Unidos 5.322.938), o elemento genético *attB1/R1* (O-Lam.*attB1/R1*), o gene de SPC/STR, a região de codificação de *AsnS* respectiva (CR), o elemento genético de *attB2/R2* (O-Lam.*attB2/R2*), o terminador de inibidor II de protease de batata (St.Pis), o promotor de NOS de *Agrobacterium* (P-AGRtu. nos, Fraley e outros, 1983), a borda esquerda de *Agrobacterium* (O-OTH. - LB), o gene de resistência de canamicina (CR-OTH. - Kan, Patente dos Estados Unidos 6.255.560), e a origem de *E. coli* de replication (*Ec.ori.Cole*).

Os constructos de DNA foram ampliados em células de Library Efficiency® DB3.1™ (Invitrogen Corporation) sob seleção de cloranfenicol (25 µg/mL) e seleção de canamicina (50 µg/mL) para pMON79706, pMON79700 ou pMON79653. O DNA de vetor foi purificado a partir de culturas bacterianas empregando-se um *kit* de Plasmídeo QIAGEN (QIAGEN Inc.).

DNA para pMON79700, pMON79706, e pMON79653 foi introduzido nos embriões de milho como descrito na Patente US Nº 5.015.580, empregando-se o dispositivo de liberação de gene de aceleração de partícula de descarga elétrica. Para bombardeio de microprojétil de embriões imaturos pré-cultivados de LH59, 35% a 45% de voltagem máxima foi preferivelmente empregada. Seguindo o bombardeio de microprojétil, o tecido de milho foi cultivado no escuro a 27°C. Métodos de transformação e materiais para preparar plantas transgênicas desta invenção, por exemplo, vários meios e cé-

lulas alvo de recipiente, transformação de embriões imaturos e regeneração subsequente de plantas transgênicas férteis são descritos nas Patentes U.S. 6.194.636 e 6.232.526 e Publicação de Pedido de Patente U.S. 20040216189, que estão incorporados aqui por referência.

5 Plantas de milho transgênicas férteis foram produzidas a partir de células de milho transformadas cultivando-se calo transformado nos meios de regeneração apropriados para iniciar o desenvolvimento do broto e formação de plantinha. As plantinhas foram transferidas para o solo quando elas estavam com o talo em torno de 7,62 cm e possuíam raízes (cerca de
10 quatro a 6 semanas depois da transferência para o meio). As plantas foram mantidas durante duas semanas em uma câmara de crescimento a 26°C, seguido por duas semanas em uma bancada de névoa em uma estufa. As plantas foram subsequentemente transplantadas em potes de 18,93 litros (5 galões) e cultivadas até a maturidade na estufa. Polinizações recíprocas fo-
15 ram feitas com a linhagem congênita de LH59 de milho. Semente foi coletada a partir de plantas de milho e empregada para análise de proteína e outras atividades de procriação.

Exemplo 3

Construção de vetor e transformação de milho com seqüências de polinucleotídeo de *AsnS*

20 O *AsnS2* de milho (SEQ ID NO: 3, pMON79706, FIG. 1) foi ampliado por uso de PCR (reação em cadeia de polimerase). As condições de reação para a reação de PCR seguiram o protocolo do fabricante (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Aproximadamente 100 ng de DNA de mi-
25 lho, preparado como descrito acima, foram ampliados empregando-se 30 nmols cada qual do iniciador dianteiro (f) (SEC ID NO: 32) e iniciador reverso (r) (SEQ ID NO: 33) e 10 micromols cada de dATP, dCTP, dGTP e TTP, 2,5 unidades de TaKaRaLA Taq em 1X de Tampão de LA PCR II (Takara Bio INC, Shiga, o Japan). Depois da incubação inicial a 94°C durante 1 minuto,
30 35 ciclos de PCR foram realizados a 94°C durante 45 segundos, seguido por recozimento a 60°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto e 15 segundos, seguido, por 1 ciclo de 72°C durante 7 minutos.

Cinco constructos de DNA de *AsnS2* foram feitos. O primeiro constructo de *AsnS2* de milho foi feita isolando-se um fragmento de *AsnS2* de 1821 pares de base de pMON79706 por PCR, como descrito acima, seguido por digestão de restrição com enzimas de restrição de XbaI e EcoRI.

5 O gene de *AsnS2* resultante foi ligado em pMON61560, que foi da mesma forma digerido por XbaI e EcoRI. O vetor de transporte (pMON66246) foi digerido por NotI e a inserção contendo o gene de *AsnS2*, em ligação operável com o promotor de PPDK e terminador de RGLUT1, foi ligada em pMON30167, que foi da mesma forma digerida por NotI. O plasmídeo

10 pMON30167, que contém o gene de EPSPS, fornece seleção com glifosato. O plasmídeo final resultante foi designado pMON66230 (FIG. 3).

Um segundo constructo de *AsnS2* foi feito empregando-se o gene de *AsnS2* anteriormente mencionado (pMON79706). O constructo foi feito por inserção do gene *AsnS2* digerido por XbaI/EcoRI em pMON61562, que

15 da mesma forma foi digerido por XbaI e EcoRI, resultando no gene *AsnS2* sendo em ligação operável com o promotor de NAS e o terminador de RGLUT1. O plasmídeo resultante foi digerido por NotI e ligado no pMON30167 digerido por NotI. O plasmídeo resultante foi designado pMON66229 (FIG. 2).

20 Um terceiro constructo de *AsnS2* foi feito empregando-se o gene *AsnS2* anteriormente mencionado (pMON79706). O promotor de P-FDA empregado neste constructo foi isolado a partir de pMON78810 por digestão com enzimas de restrição de NotI e XbaI. O promotor de P-FDA foi em seguida ligado em pMON66246, que foi previamente digerido por NotI e XbaI

25 para remover seu promotor de PPDK. O plasmídeo resultante foi digerido por NotI e ligado no pMON30167 digerido por NotI. O plasmídeo resultante foi designado pMON66231 (FIG. 4).

Um quarto constructo de *AsnS2* foi feito empregando-se o gene *AsnS2* anteriormente mencionado (pMON79706). O promotor de P-RTBV a

30 ser empregado neste constructo foi gerado por PCR de pMON74576. O fragmento de 721 bp foi digerido por NotI e XbaI e ligado em pMON66246, que previamente foi digerido por NotI e XbaI. O plasmídeo resultante, con-

tendo o gene *AsnS2* em ligação operável com o promotor de P-RTBV e terminador de RGLUT1 foi digerido por NotI e ligado no pMON30167 digerido por NotI. O plasmídeo resultante foi designado pMON66239 (FIG. 5).

Um quinto constructo de *AsnS2* foi feito empregando-se o gene

5 *AsnS2* anteriormente mencionado (pMON79706). Um par de iniciador de ZmASsense,

5'TCCTAGACATGTCCGGCATACTTGCTG3' (SEQ ID NO:46) e ZmASantisense,

5'TGCAGAATTCTATCCCTCGATGG; (SEQ ID NO:47),

10 foi empregado para ampliar *AsnS2* de milho de pMON66240. A organização de PCR foi como segue: em um volume total de 50 μ l de reação de PCR, 1 μ l de 10 mM de cada iniciador de ZmASsense e ZmASantisense, 0,2 a 0,5 μ g (1 μ l) de DNA de plasmídeo de pMON66240, 5 μ l de Mistura de Reação de 10X AccuPrime® Pfx, 1 μ l de DNA Polimerase ACCuPrime® Pfx (Invitrogen), e 41 μ l de água destilada. A reação de PCR foi realizada com os seguintes parâmetros de ciclo: 94°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 15 segundos para desnaturação; 58°C durante 15 segundos de recozimento, e 68°C durante 4 minutos; seguido por 10 minutos de extensão a 68°C. O produto de PCR foi purificado empregando-se um kit de

20 purificação de PCR de QIAGEN (QIAGEN Inc.). Uma alíquota do produto de *AsnS2* de milho de PCR foi digerida com enzima de restrição de NcoI e EcoRI e outra alíquota do produto de PCR foi digerida com AflIII e NcoI. O fragmento de NcoI e EcoRI foi em seguida clonado em sítios de NcoI e EcoRI de pMON94901. O fragmento de extremidade 5' de AflIII e NcoI de *AsnS2* de milho foi clonado no NcoI e EcoRI do fragmento de *AsnS2* de milho no

25 sítio de NcoI. O plasmídeo resultante (pMON74940), contendo *AsnS2* de milho em ligação operável com o promotor de e35S e o terminador de Hsp17, foi digerido por NotI e ligado em pMON53616 digerido por NotI para construir pMON74946.

30 Cada constructo descrito acima continha um cassete de expressão para expressão de um EPSPS Tipo II insensível a glifosato como um meio para selecionar eventos transgênicos (Patente U.S. 5.633.435). A se-

qüência de ácido nucléico de cado constructo foi determinada empregando-se metodologia padrão como mencionado por terminador v.3.0 PE Applied Biossistems (PE Applied Biossistems, Foster City, CA) e a integridade das junções de cloneagem confirmada. Os vetores pMON66229, pMON66230, pMON66231, pMON66239, e pMON74946 foram empregados na transformação subsequente de células de milho e regeneração destas células em plantas de milho intactas. Os constructos de interesse foram introduzidas em embriões imaturos de linhagem de milho LH244 por um método de transformação mediado por *Agrobacterium*, por exemplo, como descrito no Pedido de Patente Publicado U.S. 20050048624.

Exemplo 4

Análise de proteína e aminoácido de amostras de semente de milho.

Este exemplo apresenta um método de análise de proteína e aminoácido para selecionar semente da presente invenção com proteína e asparagina aumentada empregando-se HPLC e medidas de infravermelho próximas. Para análise de proteína de semente, amostras de volume pequenas consistindo em 50 - 100 sementes para cada tratamento foram medidas empregando-se espectroscopia de transmitância de infravermelho próxima (Infratec modelo 1221, Tecator, Hoganas Sweden). Este procedimento foi baseado na observação que uma relação linear existe entre a absorção de radiação infravermelha próxima e a quantidade de componentes químicos compreendida em uma amostra de semente típica. Antes de analisar amostras desconhecidas, dados espectrais foram coletados com amostras de calibre que foram subsequentemente analisadas empregando-se uma técnica de análise primária. A técnica primária empregada foi combustão de nitrogênio (Murray e Williams, 1987). Um modelo multivariado foi desenvolvido empregando-se os dados espectrais do espectrômetro e os dados primários. No presente caso, um modelo multivariado PLS 1 (Partial Least Squares Regression Type I) foi construído empregando-se 152 amostras de calibre. Cada amostra desconhecida foi varrida no espectrômetro pelo menos cinco vezes e seu teor de proteína pré-dito com cada varredura. Cada tempo que a amostra foi varrida, foi adicionado outra vez a cubeta de amostra para for-

necer uma representação exata da amostra testada. Os valores de proteína pré-ditos foram calculados para as varreduras múltiplas e em seguida relatados para cada amostra.

Análise de aminoácido livre foi realizada em tecidos de milho por HPLC. Para cada amostra, 20 - 50 mg de tecido de liofilizado foi extraído com 1,5 mL de 10% de ácido tricloroacético em tubos de micrófago de 2 mL. Amostras foram extraídas em temperatura ambiente durante a noite com agitação suave. Amostras extraídas foram clareadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido durante outra análise. Análise de aminoácido livre foi realizada por HPLC em uma HPLC Agilent Serie 1100 com um detector de fluorescência e autoamostrador de placa de 96 cavidades equipado com uma coluna Zorbax Eclipse AAA C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 microns, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) e coluna protetora analítica Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 12,5 mm, 5 microns). Amostras foram pré-derivatizadas com o-ftalaldeído imediatamente antes da separação. Aminoácidos livres foram resolvidos com um tampão de fosfato de 40 mM, pH 7,6 / gradiente de Metanol/Acetonitrilo seguido por detecção de fluorescência a 340 nm / 450 nm (excitação / emissão). Aminoácidos livres foram quantificados com base em padrões de aminoácido externos e picos foram integrados com *software* ChemStation (Agilent). Desvios padrão relativos foram tipicamente menores do que 8%.

Exemplo 5

Avaliação de campo de níveis de asparagina e teor de proteína de grão em plantas de milho transgênicas.

Este exemplo apresenta os resultados de uma avaliação de campo dos efeitos do constructo de *AsnS* de milho (pMON79706 e pMON92870) em asparagina e níveis de proteína em semente e plantas de milho transformadas; e os efeitos dos constructos de *AsnS* de milho (pMON79700 e pMON79653) sobre o teor de proteína de grão. A concentração relativa de asparagina livre em tecidos de milho foi obtida a partir de linhagens inatas derivadas de plantas de milho R₀ transformadas com pMON79706 ou pMON92870. Para pMON79706, transformantes de R₀ fo-

ram cruzados reversivelmente ao inato origem, LH59, para criar semente de BC₁. A semente de BC₁ que segrega com o transgene, foi plantada em uma sementeira de campo e plantas individuais foram marcadas quanto à presença do gene marcador de NPTII. O tecido da folha foi coletado para análise de aminoácido livre de plantas positivas de transgene e negativas de transgene para cada evento transgênico para análise de aminoácido livre. Aminoácidos livres de folha de plantas transgênicas de pMON79706 foram comparados às plantas de isolina negativa dentro de cada evento e analisados estatisticamente pelo teste T de Student com o *software* JMP 5.1 (SAS Institute, Cary, NC). Para pMON92870, transformantes de R₀ foram cruzados reversivelmente ao inato de origem, LH244, para criar semente de BC₁. A semente de BC₁ foi plantada em uma sementeira de campo e autopolinizada para criar a semente de BC₁S₁, que subsequente mente foi plantada em uma segunda sementeira congênita. Plantas positivas de transgene foram identificadas para cada evento transgênico seguindo marcação quanto à presença do gene marcador de NPTII. Tecido de folha foi coletado a partir de plantas de BC₁S₁ positivas de transgene e lotes inatos parentais plantados em intervalos regulares na sementeira. Aminoácidos livres de folha para pMON92870 foram analisados estatisticamente realizando-se análise de variação e comparando entradas transgênicas ao controle parenteral conduzindo-se teste T Student empregando-se *software* SAS 9.1. Para análises de aminoácido livre para ambos os constructos, tecido de folha foi coletado por remoção de uma folha totalmente expandida superior em um ântese seguido por congelamento em gelo seco. Amostras de folha foram moídas congeladas, liofilizadas, e medidas quanto ao teor de aminoácido livre por HPLC.

Eventos transgênicos múltiplos de pMON79706 e pMON92870 foram observados para mostrar aumentos significativos no teor de asparagina na folha (Tabela 2). Quatro de sete eventos de pMON79706 testados mostraram aumentos significantes na concentração de asparagina na folha, como indicado por um valor de p de 0,05 ou menor. Em eventos transgênicos de pMON92870, expressando um segundo gene de asparagina sintetase de milho, quatro de cinco eventos mostraram aumentos significantes em

níveis de asparagina na folha (Tabela 2). Estes dados mostram que expressão transgênica de *AsnS2* de milho e *AsnS3* de milho sob promotor de actina de arroz em pMON79706 e pMON92870, respectivamente, pode resultar em um aumento específico em asparagina livre, que é consistente com a superexpressão de asparagina sintetase ativa.

A concentração relativa de proteína em semente de milho foi obtida a partir de linhagens inatas derivadas a partir de plantas de milho R₀ transformadas com pMON79706 ou pMON92870. Plantas transgênicas de BC₁ de pMON79706 (descritas acima) foram autopolinizadas e o grão de BC₁S₁ resultante foi cultivado até a maturidade e medido quanto ao teor de proteína por espigas únicas. Proteína foi medida como uma porcentagem em peso seco a 0% de umidade. Proteína de grão para plantas transgênicas de pMON79706 foi comparada para plantas de isolina negativas dentro de cada evento e estatisticamente analisadas pelo teste T de Student com *software* SAS 9.1. Para pMON92870, plantas de BC₁S₁ foram autopolinizadas e cultivadas até a maturidade e medidas quanto ao teor de proteína por únicas espigas. Proteína de grão para pMON92870 foi estatisticamente analisada com um método espacial desenvolvido de costume conduzindo-se uma análise por localização. A análise por localização é um processo de duas etapas. A primeira etapa na análise envolveu estimar a autocorrelação espacial no campo ajustando-se um modelo de semivariograma esférico anisotrópico empregando-se todos os lotes de teste espaciais que foram colocados sistematicamente no campo (cada 6^o lote). O segundo estágio de análise envolveu ajustar os valores das entradas transgênicas para a variabilidade espacial empregando-se a estrutura de autocorrelação espacial estimada no primeiro estágio da análise. Seguindo o ajuste para autocorrelação espacial, comparação média foi realizada onde o valor médio de uma entrada transgênica foi comparado ao controle parental para testar a significação estatística da diferença entre um transgene e a média de controle.

Eventos múltiplos de ambos pMON79706 e pMON92870 mostraram aumentos significantes no teor de proteína de grão inato (Tabela 3). Três de cinco eventos de pMON79706 que foram estatisticamente analisa-

dos mostraram aumentos significantes no teor de proteína de grão ($p < 0,05$) e dois outros eventos mostraram tendências para aumentos significantes ($p < 0,15$). Dois eventos não devolveram números suficientes de espigas para uma análise estatística. Três de quatro eventos transgênicos de pMON92870 mostraram aumentos significantes em teor de proteína de grão ($p < 0,1$), com um evento não testado devido aos números insuficientes de espigas para análise. Estes dados confirmam que pMON79706 e pMON92870 produzem eventos transgênicos que aumentam teor de proteína de grão no milho além do teor de asparagina na folha crescente.

10 Tabela 2. Concentrações de asparagina na folha relativas em milho inato transformado com gene AsnS2 de milho (pMON79706) ou gene AsnS3 de milho (pMON92870).

Constructo ^a	Evento	Geração	Média de Transgênicas ^b Plantas positivas	Média de Transgênicas Plantas negativas	Diferença	Valor de p
pMON79706	ZM_M50965	BC ₁	16,3	10,7	5,6	0,319
	ZM_M50973	BC ₁	32,0	7,3	24,3	0,025
	ZM_M50974	BC ₁	25,0	5,3	19,8	0,014
	ZM_M50980	BC ₁	18,0	5,3	12,5	0,001
	ZM_M50984	BC ₁	29,3	10,3	19,1	0,002
	ZM_M50985	BC ₁	15,7	6,3	9,5	0,278
	ZM_M51011	BC ₁	15,0	7,3	7,7	0,191
pMON92870	ZM_M102252	BC ₁ S ₁	22,5	0,0	22,5	< 0,001
	ZM_M103304	BC ₁ S ₁	18,8	0,0	18,8	< 0,001
	ZM_M103315	BC ₁ S ₁	30,6	0,0	30,6	< 0,001
	ZM_M103316	BC ₁ S ₁	2,6	0,0	2,6	0,55
	ZM_M103320	BC ₁ S ₁	30,0	0,0	30,0	< 0,001

^a Asparagina na folha foi determinada em duas experiências separadas para pMON79706 e pMON92870.

15 ^b Asparagina livre relativa medida como uma porcentagem de aminoácidos livres totais no tecido da folha

Tabela 3. Teor de proteína de grão no milho inato transformado com gene AsnS2 de milho (pMON79706) ou gene AsnS3 de milho (pMON92870).

Constructo ^a	Evento	Geração	Média de Transgene-Plantas ^a positivas	Média de Transgene-Plantas negativas	Diferença	Valor de p
pMON79706	ZM_M50965	BC ₁	nd ^c	nd	nd	nd
	ZM_M50973	BC ₁	15,1	11,6	3,5	0,024
	ZM_M50974	BC ₁	nd	nd	nd	nd
	ZM_M50980	BC ₁	13,8	12,0	1,8	0,118
	ZM_M50984	BC ₁	15,1	11,4	3,7	0,002
	ZM_M50985	BC ₁	13,9	10,8	3,1	0,003
	ZM_M51011	BC ₁	13,5	11,4	2,2	0,08
pMON92870	ZM_M102252	BC ₁ S ₁	13,3	11,9	1,4	0,096
	ZM_M103304	BC ₁ S ₁	13,7	11,9	1,8	0,042
	ZM_M103315	BC ₁ S ₁	nd	11,9	nd	nd
	ZM_M103316	BC ₁ S ₁	11,2	11,9	-0,7	0,373
	ZM_M103320	BC ₁ S ₁	14,2	11,9	2,3	0,003

^a Proteína de grão foi determinada em duas experiências separadas para pMON79706 e pMON92870.

5. ^b Proteína de grão medida como uma porcentagem de composição de grão total em uma base de umidade a 0%.

^c nd; não determinado.

10 A asparagina elevada e fenótipo de proteína de grão pMON79706 foram confirmados em tecidos múltiplos em uma segunda experiência. Depois da geração de BC₁, cinco eventos de pMON79706 foram autopolinizados em duas sementeiras seguintes para gerar a semente de BC₁S₃ que foi homozigota para o transgene. A concentração relativa de asparagina que é o resultado da expressão do constructo de pMON79706 foi

15 determinado em um estudo no estágio de crescimento V8 do milho comparando-se as plantas BC₁S₃ homozigotas e um controle de variedade de milho LH59 (Tabela 4). Controles e entradas transgênicos foram plantados em um projeto de bloco completo aleatorizado com 5 blocos reproduzidos em um lote de campo. As folhas completamente expandidas superiores e se-

ções de caule de duas plantas foram experimentadas e agrupadas, colocadas em gelo seco, moídas, liofilizadas, e medidas quanto ao teor de aminoácido livre por HPLC. Os valores seguidos por " * " indicam uma diferença significativa do controle de LH59 (teste de uma cauda de Dunnett; (SAS 9.1, Cary, NC). Medidas de asparagina tiradas tanto no estágio de crescimento V8 quanto na geração de R₁ mostraram que plantas de cinco eventos de pMON79706 tiveram aumentos significantes em asparagina livre. Níveis de asparagina livre relativos em tecido de folha de V8 foram aumentados até 13,9% quando comparados a 3,4% no controle de variedade de LH59, e asparagina no talo foi aumentada até 39% quando comparada a 9,6 no controle (Tabela 4). Para análise de proteína de grão, 10 espigas foram experimentadas por lote, debulhadas e analisadas quanto a concentração de proteína de grão. Proteína de grão também foi aumentada significativamente nos cinco eventos de pMON79706 (Tabela 4). Os resultados mostram que, como uma tendência geral, eventos que produzem um aumento significativo em asparagina também produzido como aumento significativo na proteína da semente (Tabelas 2 a 4).

Tabela 4. Concentrações de asparagina relativas em estágio de crescimento V8 e concentração de proteína de grão na maturidade em plantas de milho BC₁S₃ transformadas com o gene AsnS2 de milho (pMON79706).

Evento	Folha		Talo		Grão
	% de Asn	Asn (ppm)	% de Asn	Asn (ppm)	% de Proteína
LH59 de controle	Média	Média	Média	Média	Média
	3,54	389	9,6	2254	12,3
ZM_M50974	12,31 *	1312 *	32,20 *	9179 *	14,8 *
ZM_M50980	10,20 *	1058 *	38,68 *	12844 *	15,2 *
ZM_M50984	9,18 *	997 *	28,20 *	8062 *	14,4 *
ZM_M50985	5,86 *	697	15,12 *	3404	14,5 *
ZM_M51011	13,89 *	1740 *	37,05 *	11820 *	15,0 *

* Significante em p<0,05

Aumentos significantes na proteína de grão híbrido foram observados por três constructos diferentes que expressam genes de asparagina sintetase sob o promotor de actina de arroz. Linhagens de milho inatas ho-

mozigotas foram produzidas de eventos transgênicos de R_0 de pMON79706 (AsnS2 de milho), pMON79700 (AsnS de soja), e pMON79653 (AsnS1 de levedura) primeiro por cruzamento reversível de eventos de R_0 à origem repetida, LH59, seguido por autopolinizações de seleções positivas de transgene em duas sementeiras inatas subseqüentes empregando-se o marcador selecionável de NPTII para marcar quanto a zigosidade. Os eventos homozigotos para cada constructo foram, em seguida, empregados como um doador de pólen macho em um cruzamento com uma linhagem inata fêmea para criar o híbrido de F_1 . A semente híbrida de F_1 foi plantada em uma experiência de múltiplas localizações e eventos transgênicos para cada constructo foram analisados quanto a proteína de grão final e comparados ao controle híbrido de origem repetida periódica seguindo uma análise de correção espacial com base na proteína de grão em híbridos de controle que foram plantados em intervalos regulares ao longo do campo. O grão foi colhido de cada lote, debulhado e analisado quanto ao teor de proteína. Os dados foram analisados empregando um método espacial desenvolvido de costume conduzindo-se uma análise por localização e uma de localização em cruz. A análise por localização é um processo de duas etapas. A primeira etapa na análise envolveu estimar a autocorrelação espacial no campo ajustando-se um modelo de semivariograma esférico anisotrópico empregando-se todos os lotes de teste espaciais que foram colocados sistematicamente no campo (cada 3º lote). O segundo estágio de análise envolveu ajustar os valores das entradas transgênicas para a variabilidade espacial empregando-se a estrutura de autocorrelação espacial estimada no primeiro estágio da análise. Seguindo o ajuste para autocorrelação espacial em cada localização separadamente, uma análise de localização em cruz foi conduzida onde o valor médio de uma entrada transgênica foi extraída comparado ao controle parental para testar a significação estatística ($P=0,20$) da diferença entre um transgene e o meio de controle. Todos os cinco eventos de pMON79706 mostraram aumentos significantes em proteína de grão na experiência híbrida, consistente com a observação que a proteína de grão foi aumentada nas linhagens inatas de eventos transgênicos deste constructo

(Tabela 5). Dois outros constructos de asparagina sintetase, pMON79700 (AsnS de soja) e pMON79653 (AsnS de levedura), também mostraram aumentos significantes em níveis de proteína de grão em dois de cinco eventos e dois de dois eventos, respectivamente.

5 Tabela 5. Teor de proteína de grão em milho híbrido transformado com genes para asparagina sintetase de milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)^a.

Constructo	Gene	Evento	Média Transgênica de Proteína	Média de Controle de Proteína	Proteína Delta	Valor de p
pMON79706	AsnS2 de Milho	ZM_M50974	11,12	8,65	2,48	0,000
		ZM_M50980	9,17	8,65	0,53	0,003
		ZM_M50984	9,56	8,65	0,91	0,000
		ZM_M50985	9,71	8,65	1,07	0,000
		ZM_M51011	9,45	8,65	0,81	0,000
pMON79700	AsnS de Soja	ZM_M49436	8,52	8,65	-0,13	0,469
		ZM_M61615	11,25	8,65	2,61	0,000
		ZM_M62422	13,30	8,65	4,65	0,000
		ZM_M62428	8,61	8,65	-0,04	0,826
		ZM_M64520	8,76	8,65	0,11	0,570
pMON79653	AsnS1 de Levedura	ZM_M49883	9,12	8,65	0,48	0,007
		ZM_M65281	9,43	8,65	0,79	0,000

^a Proteína de grão medida como uma porcentagem de composição de grão total em uma base de umidade a 0%.

10 Exemplo 6

Avaliação de campo da expressão de transgene e atividade de enzima de asparagina sintetase devido à pMON79706 e pMON92870

Expressão de transgene foi confirmada em eventos transgênicos de pMON79706 e pMON92870. Para pMON79706, tecido empregado para a determinação do teor de asparagina na folha na experiência de campo com linhagens inatas homozigotas de BC₁S₃ foi, da mesma forma, empregado para determinação da expressão de transgene com base na medida da expressão da seqüência de terminador 3' (St.Pis4) de pMON79706 em ântese.

Duas amostras de folha foram colhidas e agrupadas de cada dentre 5 lotes de réplica (10 para controle inato) e congeladas em gelo seco. Amostras de folha foram, em seguida, moídas congeladas para análise de expressão. Para extração de RNA, 50 mg de tecido congelado foram aliquotadas em 5 placas de 96 cavidades. Cada amostra foi extraída com 500 µl de tampão de lise contendo uma solução de 1:1 de solução de lise de ácido nucléico de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA) para 1X de PBS ph 7,4 (sem MgCl ou CaCl). RNA foi extraído de amostras de tecido congeladas frescas empregando-se placas de filtro para capturar ácidos nucléico de lisados crus, e 10 50 µl de tampão de eluição de ABI foram empregados para eluir RNA ligado. PCR quantitativa foi realizada empregando-se um padrão de RNA com 5 µl com 5 µl de reagente de RT-PCR de uma etapa de ABI. As reações foram realizadas durante 40 ciclos de PCR em um instrumento de PCR ABI Taqman 7900, com parâmetros de ciclagem de 48°C durante 30 minutos, 95°C 15 durante 10 minutos, 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 1 minuto. Medidas fluorescentes foram tiradas de cada cavidade em cada dentre os 40 ciclos igualmente para a seqüência de terminator derivada do inibidor de protease de batata II (St.Pis4) e o controle endógeno (ubiquitina). Um subgrupo de amostras foi conduzido sem transcriptase reversa para monitorar a con- 20 taminação de DNA. As amostras foram marcadas quanto a expressão relativa subtraindo-se os valores limiares de ciclo para St.Pis4 do valor limiar de ciclo do controle endógeno. O limiar de ciclo (Ct) foi determinado, e o Ct de delta foi calculado de St.Pis4 menos o valor de controle endógeno. Um tipo silvestre *in situ* foi criado calculando-se os sinais de controle endógeno médio e fixando-se o valor de sinal de St.Pis4 em 40. O Ct de delta das amos- 25 tras desconhecidas foi subtraído do Ct de delta do tipo silvestre *in situ*. Dados finais foi relatado como expressão de pinII (St.Pis4) relativos ao tipo silvestre. Análise de RT-PCR quantitativa confirmou a superexpressão do transgene de seis de seis eventos de pMON79706 (FIG. 6).

30 Expressão de transgene também foi confirmada em eventos inatos que compreendem pMON92870. Expressão de RNA foi determinada do tecido de folha em ântese de plantas inatas cultivadas em uma sementeira

de campo colhendo-se primeiro uma folha expandida superior de cada planta (4-8 plantas por evento) e congelando-se em gelo seco. Plantas positivas de transgene foram previamente identificadas com base na presença do gene marcador de NPTII. Tecido de folha foi moído enquanto congelado, e
5 analisado quanto a expressão da seqüência de terminador 3' (St.Pis4) de pMON92870. Análise de RT-PCR quantitativa mostrou que cinco de seis eventos que compreendem pMON92870 mostraram expressão de transgene aumentada quando comparados a um controle inato (FIG. 7). A baixa expressão de RNA no evento de pMON92870 ZM_M103316 é consistente com
10 o baixo teor de asparagina na folha e teor de proteína de grão neste evento.

O efeito de expressão de genes de asparagina sintetase sobre a atividade de asparagina sintetase foi medido em eventos transgênicos de pMON79706 e pMON92870. Tecido de folha moído, congelado foi aliqotado (200 - 400 mg) em cavidades de uma placa de 96 cavidades profundas
15 pré-resfriadas. Proteína foi extraída em Tampão A (100 mM de Hepes-OH, pH 8,0, 0,1 mM de EDTA, 10 mM de MgCl₂, 2 mM de aspartato, 0,5 mM de DTT, 67 mM de mercaptoetanol, 20% (v/v) de glicerol, 0,1 mM de ATP, 1% (v/v) de P9599 (Sigma Company), 25 mM de KCl). Uma quantidade pequena de areia foi adicionada a cada cavidade. Tampão A foi, em seguida, adicionado ao tecido da folha nas cavidades em uma relação de 4:1 (tam-
20 pão:tecido). As placas foram, em seguida, agitadas em um agitador de pintura durante 2 minutos para misturar a amostra e, em seguida, centrifugadas em 5000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante (100 - 200 µL) foi dessalinizado em uma placa macro giratória de 96 cavidades (SNS S025L, The Nest Group Inc., Southboro, MA) equilibrada em tampão A. O sobrenadante foi, em seguida, analisado imediatamente ou congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até empregado. Para analisar a atividade de asparagina sintetase, extratos de proteína dessalinizados (10-50 µL) foram adicionados às cavidades contendo 100 µL de solução de ensaio (100 mM de He-
25 pes, pH 8,0, 10 mM de MgCl₂, 2 mM de aspartato, 5 mM de DTT, 10 mM de ATP, 1 mM de ácido amino(oxi)acético (inibidor de aspartato amino transferase), 1 mM de semialdeído aspártico (inibidor de asparaginase). Para
30

começar a reação, glutamina (concentração final de 2 mM para ensaio padrão) foi adicionada à solução, que foi em seguida misturada. A mistura de ensaio foi, em seguida, incubada durante 1 a 2 horas. A reação foi, em seguida, interrompida pela adição de um volume igual de 20% (p/v) de ácido tricloroacético. A mistura foi, em seguida, filtrada para remover o precipitado e asparagina foi medido por HPLC. Tamanho da amostra foi aumentado de 0,5 μ L para 2,5 μ L para HPLC, comprimento de onda de excitação foi reduzido de 340 nm para 235 nm, e o ganho de fluorímetro foi aumentado de 10 para 13. Isto resulta em uma sensibilidade de detecção de 0,5 para 100 μ M de asparagina e permite a medida de níveis de atividade nos 100s microunidades.

Para pMON79706, tecido empregado para a determinação da atividade de enzima de asparagina sintetase na folha foi de uma experiência de campo com linhagens inatas homozigotas de BC₁S₃ colhidas no estágio de crescimento de V7. Eventos de pMON79706 foram mostrados para exibir atividade de asparagina sintetase de folha aumentada (Tabela 6). A atividade de asparagina sintetase foi aumentada até 5 vezes sobre o controle de variedade inata. Atividade de enzima de asparagina sintetase também foi determinada para eventos transgênicos de pMON92870 em uma sementeira de campo inato no momento de ântese. Quatro de cinco eventos de pMON92870 também mostraram atividade de enzima aumentada (Tabela 6). A atividade de enzima de asparagina sintetase aumentada em plantas de milho que expressam o AsnS2 de milho (pMON79706) ou AsnS3 de milho (pMON92870) sob o promotor de actina de arroz é consistente com o aumento na expressão de gene e aumentos de asparagina de folha observados com estes constructos.

Tabela 6. Atividade de asparagina sintetase em linhagens inatas de eventos transgênicos de pMON79706 e pMON92870^a.

Constructo	Evento	Atividade de AsnS (µunidades/mg de de proteína)
Controle	LH59	276
pMON79706	ZM_M50973	519
	ZM_M50974	1179
	ZM_M50984	1592
	ZM_M50985	450
	ZM_M51011	1031
Controle	LH244	98
pMON92870	ZM_M102252	160
	ZM_M103304	209
	ZM_M103315	243
	ZM_M103316	11
	ZM_M103319	192
	ZM_M103320	240

^a Atividades de enzima para pMON79706 e pMON92870 foram determinadas a partir de duas experiências de campo diferentes.

5 Exemplo 7

Avaliação de campo dos efeitos de pMON66231, pMON66239, e pMON74946 sobre asparagina e teor de proteína de grão

O teor relativo de asparagina livre em tecidos de milho foi obtido de linhagens híbridas derivadas de plantas de milho de R₀ (base de LH244) transformadas com pMON66231 (FIG. 4), onde *AsnS2* de milho está sob o controle do promotor de FDA de milho. Híbridos foram feitos cruzando as plantas de R₀ à linhagem inata masculina LH59, que cria uma população de F₁ segregadora (1:1). A semente F₁ resultante foi plantada em três localizações do meio-oeste com duas replicações em cada localização. Lotes foram pulverizados com glifosato no estágio de crescimento V3 para eliminar segregantes nulos. Um controle híbrido foi semeado no perímetro e comparações foram feitas ao controle híbrido. Folhas superiores foram coletadas e agrupadas de três plantas dentro de cada lote no momento de antese, duas

horas depois do pôr-do-sol, em todas as três localizações. As folhas foram colocadas imediatamente sobre gelo seco e, em seguida, armazenadas a -80°C até o processo. As folhas foram moídas congeladas, e uma porção foi liofilizada para análise de aminoácido livre por HPLC. Os dados foram primeiro avaliados quanto aos valores discrepantes com o método de duas passagens para resíduos estudados deletados empregando-se valores de p ajustados por Bonferroni. Valores discrepantes foram identificados e removidos do grupo de dados antes que a análise dos cálculos de variação discrepância fosse iniciada. Os dados foram analisados de acordo com projeto de bloco completo aleatorizado de localizações em cruz. Combinações de constructo-evento foram modeladas com efeitos fixos, e as localizações e *reps* dentro de localizações foram modelados com efeitos aleatórios. Comparações de tratamento foram feitas realizando-se contrastes dos meios de mínimos quadrados das combinações de constructo-evento. Asparagina de folha relativa foi aumentada significativamente em 11 de 12 eventos de pMON66231, com níveis de asparagina tão altos quanto 16% quando comparados a 3% no controle (Tabela 7). Proteína de grão madura foi da mesma forma medida depois da colheita de 10 espigas por lote seguido por debulhamento e agrupamento da semente para cada lote, que foi em seguida medido quanto ao teor de proteína de grão. Nove de 12 eventos foram encontrados para significativamente aumentar o teor de proteína no grão maduro sobre o controle híbrido de LH244/LH59.

Tabela 7. Asparagina na folha relativa e teor de proteína de grão maduro em eventos transgênicos de pMON66231.

Evento	% ^a de Asn na folha		% de Proteína de Grão	
	Média	valor ^b de p	Média	valor ^b de p
LH244/LH59	2,73		8,68	
ZM_S120303	11,41	< ,001	8,57	0,774
ZM_S120316	8,92	0,007	9,90	0,002
ZM_S122246	8,69	0,01	10,22	< ,001
ZM_S122249	9,85	0,002	10,83	< ,001
ZM_S122257	9,57	0,003	12,48	< ,001
ZM_S122262	10,10	0,001	9,70	0,011

Evento	% ^a de Asn na folha		% de Proteína de Grão	
	Média	valor ^b de p	Média	valor ^b de p
ZM_S122267	9,33	0,004	9,23	0,162
ZM_S122279	12,67	< ,001	11,13	< ,001
ZM_S122280	12,54	< ,001	10,90	< ,001
ZM_S122281	9,47	0,003	10,53	< ,001
ZM_S122291	16,25	< ,001	9,83	0,004
ZM_S122303	6,44	0,126	8,53	0,71

^a Asparagina livre relativa medida como uma porcentagem de aminoácidos livres totais no tecido da folha

^b Comparado ao controle híbrido.

O teor relativo de asparagina livre em tecidos de milho foi obtido de linhagens híbridas derivadas de plantas de milho de R₀ (base de LH244) transformadas com pMON66239 e pMON74946, onde AsnS2 de milho está sob o controle do promotor de RTBV ou e35S, respectivamente. Híbridos foram feitos cruzando-se as plantas de R₀ à linhagem inata masculina, LH59, que cria uma população de F₁ segregadora (1:1). A semente de F₁ resultante foi plantada em uma localização no Havaí com três replicações para cada evento transgênico. Os lotes foram pulverizados com glifosato no estágio de crescimento V3 para eliminar os segregantes nulos. Um controle híbrido que necessita do gene de *AsnS2* de milho foi incluído para comparação. Folhas superiores foram coletadas e agrupadas de três plantas dentro de cada lote na hora de ântese, duas horas depois de pôr-do-sol. As folhas foram colocadas imediatamente sobre gelo seco e, em seguida, armazenadas a -80°C até o processo. As folhas foram moídas congeladas, e uma porção foi liofilizada para análise de aminoácido livre por HPLC. Os dados foram primeiro avaliados quanto aos valores discrepantes com o método de duas passagens para resíduos estudados deletados empregando-se valores de p ajustados por Bonferroni. Valores discrepantes foram identificados e removidos do grupo de dados antes que a análise de cálculos de variação fosse iniciada. Os dados foram analisados de acordo com um projeto de bloco completo aleatorizado. Combinações de constructo-evento foram modeladas com efeitos fixos, e *reps* foram modelados com efeitos aleatórios. Comparações de

tratamento foram feitos realizando-se contrastes dos meios de mínimos quadrados das combinações de constructo-evento. Asparagina na folha relativa foi aumentada significativamente em 10 de 13 eventos de pMON74946, com níveis de asparagina tão altos quanto 16% quando comparados a 2% no controle (Tabela 8). Proteína de grão maduro também foi medida depois da colheita de todas as espigas por lote seguida por debulhamento e agrupamento da semente para cada lote, que foi em seguida medida quanto ao teor de proteína de grão e analisada estatisticamente quanto à característica de asparagina na folha. Dez de treze eventos foram encontrados para possuir teor de proteína significativamente aumentado no grão maduro quando comparado ao controle híbrido, e os mesmos 10 eventos com asparagina na folha aumentada também mostraram proteína aumentada na experiência de híbrido. Para eventos transgênicos de pMON66239, 11 de 15 eventos mostraram aumentos no teor de asparagina na folha, e 3 de 15 eventos mostraram aumentos significantes na proteína de grão no nível alfa de 0,05, embora cinco eventos transgênicos adicionais mostraram proteína aumentada em $p < 0,15$, indicando que a expressão de *AsnS2* de milho sob o promotor de RTBV (pMON66239) pode aumentar o teor de asparagina na folha e teor de proteína de semente, mas em uma extensão menor que sob o promotor de e35s (pMON74946) (Tabela 8).

Tabela 8. Asparagina na folha relativa e teor de proteína de grão maduro em pMON74946 e eventos transgênicos de pMON66239.

Constructo	Evento	% ^a de Asn na folha		% de Proteína de Grão	
		Média	valor ^b de p	Média	Valor ^b de p
Controle	Controle híbrido	1,47		7,98	
pMON74946	ZM_S156600	10,37	< ,0001	8,67	0,0398
	ZM_S156602	1,23	0,7315	8,43	0,1728
	ZM_S156606	0,39	0,1214	7,43	0,0995
	ZM_S156613	0,71	0,2786	7,70	0,3959
	ZM_S156634	14,79	< ,0001	9,37	< ,0001
	ZM_S156636	12,28	< ,0001	9,23	0,0002
	ZM_S160005	15,57	< ,0001	9,50	< ,0001

Constructo	Evento	% ^a de Asn na folha		% de Proteína de Grão	
		Média	valor ^b de p	Média	Valor ^b de p
	ZM_S160015	15,85	< ,0001	13,10	< ,0001
	ZM_S160025	13,41	< ,0001	9,13	0,0007
	ZM_S160026	11,94	< ,0001	9,17	0,0005
	ZM_S160034	11,00	< ,0001	9,60	< ,0001
	ZM_S160037	15,79	< ,0001	9,10	0,001
	ZM_S160042	14,73	< ,0001	9,17	0,0005
pMON66239	ZM_S140597	8,84	< ,0001	11,03	< ,0001
	ZM_S140601	2,14	0,3419	8,20	0,5078
	ZM_S140609	10,08	< ,0001	8,50	0,1182
	ZM_S140613	2,67	0,0881	8,50	0,1182
	ZM_S140615	1,23	0,7333	8,20	0,5078
	ZM_S140617	6,68	< ,0001	8,50	0,1182
	ZM_S140618	3,93	0,0005	8,73	0,0244
	ZM_S140633	5,96	< ,0001	8,63	0,0503
	ZM_S140635	3,69	0,0017	8,37	0,2445
	ZM_S140645	5,88	< ,0001	8,37	0,2445
	ZM_S140647	3,66	0,0019	8,30	0,3353
	ZM_S140651	4,66	< ,0001	8,57	0,0784
	ZM_S140661	4,13	0,0002	8,03	0,8741
	ZM_S140663	2,07	0,61	9,03	0,0018
ZM_S140665	7,33	< ,0001	8,27	0,388	

^a Asparagina livre relativa medida como uma porcentagem de aminoácidos livres totais no tecido da folha

^b Comparado ao controle híbrido.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patente estão aqui
5 incorporados por referência a mesma extensão como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

REFERÊNCIAS

As referências seguintes, à medida que elas fornecem detalhes
10 processuais exemplares ou outros adicionais àqueles mencionados aqui,

são especificamente incorporados aqui por referência:

- Patente U.S. 4.761.373
Patente U.S. 4.957.748
Patente U.S. 5.100.679
5 Patente U.S. 5.219.596
Patente U.S. 5.322.783
Patente U.S. 5.322.938
Patente U.S. 5.538.880
Patente U.S. 5.550.318
10 Patente U.S. 5.563.055
Patente U.S. 5.610.042
Patente U.S. 5.633.435
Patente U.S. 5.936.069
Patente U.S. 6.005.076
15 Patente U.S. 6.146.669
Patente U.S. 6.156.227
Patente U.S. 6.194.636
Patente U.S. 6.232.526
Publicação do Pedido de Patente U.S. 20040216189A1
20 Publicação do Pedido de Patente U.S. 20050048624A1
Alba, *Plant J.*, 39(5): 681-808, 2004.
Allard, Em: *Principles of Plant Breeding*, 2^a Ed., John Wiley &
Sons, ISBN: 0471023094, 1999.
Altschul e outros, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997,
25 Aslanidis e de Jong, *Nucleic Acids Res.*, 18(20):6069-6074,
1990.
Ausubel e outros, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*,
John Wiley & Sons, New York, 1989.
Bevan, *Nucleic Acids Res.*, 12:8711-8721, 1984.
30 Chu e outros, *Scientia Sinica*, 18:659, 1975.
Dellaporta e outros, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21,
1983.

- D'Halluin e outros, *Bio/Technology*, 10:309-314, 1992.
- Fraley e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4803-4807, 1983.
- Haymes e outros, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC, 1985.
- 5 Hayward, Em: *Plant Breeding: Principles and Prospects*, Vol. 1, Chapman & Hall, ISBN: 0412433907, 1993.
- Henikoff e Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992.
- Herrera-Estrella e outros, *Nature*, 303:209, 1983.
- 10 Hinchee e outros, *Bio/Technology*, 6:915-922, 1988
- Jones e Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Jones e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 210(1):1-4, 1987.
- Klee e outros, *Bio-Technology*, 3(7):637-642, 1985.
- Lewin, Em: *Genes V*, Oxford University Press, NY, 1994.
- 15 Matsuoka e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9586-9590, 1993.
- Murashige e Skoog, *Physiol. Plant*, 15:473-497, 1962.
- Murray e Williams, In: *Chemical Principles of Near-Infrared Technology*, Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries,
- 20 Williams e K. Norris (Eds.), 1987.
- Pedido PCT WO 95/06128
- Reynaerts e outros, In: *Selectable and Screenable Markers*, Gelvin e Schilperoort (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer, Dordrecht, 1988.
- 25 Richards, Em: *Plant Breeding Systems*, Stanley Thornes Pub Ltd; 2ª Ed., ISBN: 0412574500, 1997.
- Rieger e outros, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edição, Springer-Verlag: New York, 1991.
- Sambrook e outros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª
- 30 Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- Stalker e outros, *J. Biol. Chem.*, 263:6310-6314, 1988.
- Thillet e outros, *J. Biol. Chem.*, 263:12500-12508, 1988.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Fabbri, Bradon J.
 Qiu, Bo-Xing
 Screen, Steven E.
 5 Andersen, Scott E.
 Crowley, James
 <120> SEMENTE E PLANTAS DE MILHO REALIZADAS PARA ASPARGINA E PROTEÍNA
 <130> MONS:089US
 <140> Desconhecido
 10 <141> 2006-05-15
 <150> 60/681,348
 <151> 2005-05-16
 <160> 49
 <170> PatentIn versão 3.3
 15 <210> 1
 <211> 1869
 <212> DNA
 <213> Zea mays
 <400> 1
 20 atgatttgtg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg taggtagacc gcgggatatc 60
 acaagtttgt acaaaaaagc aggctcctgc aggaccatgt gcggcatcct cgctgtcctc 120
 ggcgtcgtcg aggtctccct cgccaagcgc tcccgcatca ttgagctctc gcgcaggtta 180
 cggcaccgag ggcctgattg gagtggttg cactgtcatg aggattgta ccttgcacac 240
 cagcggttgg ctattatcga tctacatct ggagaccagc ctttgtacaa tgaggataaa 300
 25 acagttgttg taacggtgaa cggagagatc tataaccatg aagaattgaa agctaagttg 360
 aaaactcatg agttccaaac tggcagtgat tgtgaagtta tagcccatct ttacgaagaa 420
 tatggcgaag aatttgtgga tatgttggat ggaatgttct ctttgttct tcttgataca 480
 cgtgataaaa gcttcatcgc agctcgtgat gctattggca tctgcccttt atacatggga 540
 tggggctctg atggatcagt ctggttttct tcagagatga aggcattgag tgatgattgt 600
 30 gaacgcttca taacatttcc cccagggcat ctctactcca gcaagacagg tgggtctaagg 660
 agatggtaca acccaccatg gttttcagag acggtcctt caaccctta caatgctctc 720
 ttctccggg agatgtttga gaaggctggt attaagaggc tgatgactga tgtgccattt 780

ggtgtgcttt tatctgggtg actcgactct tctttgggtg catctgttgc ttcgcggcac 840
 ttaaacgaaa caaagggtga caggcagtgg gaaataaat tgcatacttt ctgtataggc 900
 ttgaagggtt ctctgatct taaagctgct agagaagttg ctgattacct cagcactgta 960
 catcatgagt tccacttcac agtgcaggag ggcattgatg ccttgaaga agtcatctac 1020
 5 catattgaga catatgatgt tacaacaatc agagcaagta cccaatggt tttgatgtca 1080
 cgcaaatca aatctttggg tgtgaagatg gttatttctg gcgaaggttc agatgaaatt 1140
 tttggtggtt acctttattt tcacaaggca ccaacaaga aagaattcca tgaggaaaca 1200
 tgtcgaaga taaaagcact acatctgtat gactgcttga gagctaaca agcaacttct 1260
 gcctgggggtg ttgaggctcg tgttccattc cttgacaaaa gtttcatcag ttagcaatg 1320
 10 gacattgatc ctgaatggaa gatgataaaa cgtgacctcg gtcgaattga gaaatgggtt 1380
 atccgtaatg catttgatga tgatgagagg ccctatttac ctaagcacat tctctacagg 1440
 caaaaggaac agttcagtga tgggtttggg tatagtggga tcgatggatt gaaggaccat 1500
 gccagccaac atgtctccga ttccatgatg atgaatgctg gctttgttta cccagagaac 1560
 acaccacaa caaaagaagg gtactactac agaatgatat tcgagaaatt ctttccaag 1620
 15 cctgcagcaa ggtaactgt tcctggaggt cctagtgtgg cctgcagcac tgccaaagct 1680
 gttgaatggg acgcatcctg gtccaagaac cttgatcctt ctggccgtgc tgctttgggt 1740
 gttcacgatg ctgctatga agacactgca gggaaaactc ctgcctctgc tgatcctgtc 1800
 tcagacaagg gccttcgtcc agctattggc gaaagcctag ggacaccctg tgcttcagcc 1860
 acagctgtc 1869
 20 <210> 2
 <211> 623
 <212> PRT
 <213> Zea mays
 <400> 2
 25 Met Ile Cys Asp Lys Cys Ser Leu Val Arg Ser Phe Phe Val Gly Arg
 1 5 10 15
 Pro Arg Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Cys Arg Thr
 20 25 30
 Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Val Ala Glu Val Ser Leu Ala
 30 35 40 45
 Lys Arg Ser Arg Ile Ile Glu Leu Ser Arg Arg Leu Arg His Arg Gly
 50 55 60

Ala Ala Leu Gly Val His Asp Ala Ala Tyr Glu Asp Thr Ala Gly Lys
580 585 590

Thr Pro Ala Ser Ala Asp Pro Val Ser Asp Lys Gly Leu Arg Pro Ala
595 600 605

5 Ile Gly Glu Ser Leu Gly Thr Pro Val Ala Ser Ala Thr Ala Val
610 615 620

<210> 3
<211> 1818
<212> DNA
10 <213> Zea mays
<400> 3

atgtgctggca tacttgctgt gctcgggtgc gccgacgagg ccaagggcag cagcaagagg 60
tcccgggtgc tggagctgtc gcggcggtcg aagcaccggg gccccgactg gagcggcctc 120
cggcaggtgg gcgactgcta cctctctcac cagcgctcgc ccatcatcga cccggcctct 180
15 ggcgaccagc ccctctacaa cgaggaccag tcggtggtcg tcgccgtaa cggcgagatc 240
tacaaccacc tggacctcag gagccgcctc gccggcgag gccacagctt caggaccggc 300
agcgactgcg aggtcatcgc gcacctgtac gaggagcatg gagaagagtt cgtggacatg 360
ctggacggcg tcttctcctt cgtgctgctg gacactcgcc atggcgaccg cgcgggcagc 420
agcttcttca tggctgctcg cgacgccatc ggtgtgacgc ccctctacat cggatgggga 480
20 gtcgatgggt cgggtggtgat ttcgtcggag atgaaggccc tgcacgacga gtgtgagcac 540
ttcgagatct tccctccggg gcactcttac tccagcaaca ccggcggatt cagcaggtgg 600
tacaaccctc cttggtacga cgacgacgac gacgaggagg ccgtcgtcac ccctccgctc 660
ccctacgacc cgctggcgct aaggaaggcg ttcgagaagg ccgtggtgaa gcggctgatg 720
acagacgtcc cgttcggcgt cctgctctcc ggcgggctgg actcgtcgtc ggtggcgacc 780
25 gtcgccgtgc gccacctcgc ccggacagag gccgccaggc gctggggcac caagctccac 840
tccttctgcg tgggcctgga ggggtcccct gacctcaagg cggccaggga ggtggcggag 900
tacctgggca ccctgcacca tgagttccac ttcactgttc aggacggcat cgacgccatc 960
gaggacgtga tctaccacac ggagacgtac gacgtcacca cgatcagggc gagcacgccc 1020
atgttctca tgcgcgcaa gatcaagtgc ctcgggtca agatggtcat ctccggcgag 1080
30 ggctccgacg agctcttcgg aggctacctc tacttccaca aggcgcccaa caaggaggag 1140
ttgaccgag agacgtgtag gaaggtaag gctctgcatc agtacgactg cctgagagcc 1200
aacaaggcga catcagcttg gggcctggag gctcgcgtcc cgttcctgga caaggagttc 1260

atcaatgctg ccatgagcat cgatcctgag tggaagatgg tccagcctga tcttgggaagg 1320
 attgagaagt ggggtgctgag gaaggcattc gacgacgagg agcagccatt cctgcccagg 1380
 catatcctct acagacagaa ggagcagttc agtgacggcg ttgggtacag ctggatcgat 1440
 ggctgaagg ctcatgcaac atcaaagtg actgacaaga tgctgtcaaa tgcaaagttc 1500
5 atcttcccac acaacactcc gaccaccaag gaggcctact actacaggat ggtcttcgag 1560
 aggttcttcc cacagaaatc tgctatcctg acggtacctg gtgggccaag tgtggcgtgc 1620
 agcacagcca aagccatcga gtgggacgca caatggtcag gaaatctgga ccctcgga 1680
 agggcggcac tggcgtcca tctcgccgcc tacgaacacc aacatgatcc cgagcatgtc 1740
 ccggcggcca ttgcagcagg aagcggcaag aagccaagga cgattagggt ggcaccgct 1800
10 ggcgttgcca tcgaggga 1818
 <210> 4
 <211> 606
 <212> PRT
 <213> Zea mays
15 <400> 4
 Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ala Asp Glu Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Lys Arg Ser Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His
 20 25 30
20 Arg Gly Pro Asp Trp Ser Gly Leu Arg Gln Val Gly Asp Cys Tyr Leu
 35 40 45
 Ser His Gln Arg Leu Ala Ile Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Gln Pro
 50 55 60
 Leu Tyr Asn Glu Asp Gln Ser Val Val Val Ala Val Asn Gly Glu Ile
25 65 70 75 80
 Tyr Asn His Leu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Ala Gly Ala Gly His Ser
 85 90 95
 Phe Arg Thr Gly Ser Asp Cys Glu Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Glu
 100 105 110
30 His Gly Glu Glu Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Val Phe Ser Phe Val
 115 120 125
 Leu Leu Asp Thr Arg His Gly Asp Arg Ala Gly Ser Ser Phe Phe Met

atgtgtggca tcttagccgt gctcggttgc tccgactggt ctcaggcaaa gagggctcgc 60
 atcctcgcct gctccagaag gttgaagcac aggggccccg actggtcggg cctttaccag 120
 cacgagggca acttccctggc gcagcagcgg ctcgccgtcg tctccccgct gtccggcgac 180
 cagccgctgt tcaacgagga ccgcaccgtc gtggtggtgg ccaatggaga gatctacaac 240
 5 cacaagaacg tccggaagca gttcaccggc acacacaact tcagcacggg cagtgactgc 300
 gaggtcatca tgccccgtga cgagaagtac ggcgagaact tcgtggacat gctggacggg 360
 gtgttcgctg tcgtgctcta cgacacccgc gacaggacct acgtggcggc gcgcgacgcc 420
 atcggcgtca acccgctcta catcggctgg ggcagtgacg gttccgtctg gatcgcgtcc 480
 gagatgaagg cgctgaacga ggactgcgtg cgcttcgaga tcttccccgc gggccacctc 540
 10 tactccagcg ccggcggcgg gttccggcgg tggtacaccc cgcactggtt ccaggagcag 600
 gtgccccgga cgccgtacca gccgctcgtc ctcagagagg ccttcgagaa ggcggtcatc 660
 aagaggctca tgactgacgt cccgttcggg gtctctctct ccggcggcct cgactcctcg 720
 ctagtcgcct ccgtcaccaa gcgccacctc gtcgagaccg aggccgccga gaagtccggc 780
 accgagctcc actcctttgt cgtcggcctc gagggctccc ctgacctgaa ggccgcacga 840
 15 gaggtcgtg actacctcg aaccatccat cacgagttcc acttcaccgt acaggacggc 900
 atcgacgcga tcgaggaggt gatctaccac gacgagacgt acgacgtgac gacgatccgg 960
 gccagcacgc ccatgttctt gatggctcgc aagatcaagt cgctgggctg gaagatggtg 1020
 ctgtccgggg agggctccga cgagctcctg ggcggctacc tctacttcca cttcgcccc 1080
 aacaaggagg agttccacag ggagacctgc cgcaaggatga aagccctgca ccagtacgac 1140
 20 tgcctgcgcy ccaacaaggc cacgtcggcg tggggcctgg aggtccgctg gccgttctc 1200
 gacaaggagt tcatcaacgt cgccatgggc atggaccccg aatggaaaat gtacgacaag 1260
 aacctgggccc gcatcgagaa gtgggtcatg aggaaggcgt tcgacgacga cgagcacctc 1320
 tacctgcccc agcatattct ctaccggcag aaagaacagt tcagtacgcy cgttggtctac 1380
 aactggatcg atggccttaa atccttcaact gaacagcagg tgacggatga gatgatgaac 1440
 25 aacgccgccc agatgttccc ctacaacacg cccgtcaaca aggaggccta ctactaccgg 1500
 atgatattcg agaggctctt ccctcaggac tcggcgaggg agacgggtgcc gtggggcccc 1560
 agcatcgcct gcagcacgcc ccgggccatc gactgggtgg agcagtggaa ggcctccaac 1620
 gaccctccg gccgcttcat ctctccccc gactccgccg ccaccgacca caccggcggg 1680
 aagccggcgg tggccaacgg ccggcgccac ggcgcggcga acggcacggt caacggcaag 1740
 30 gacgtcgcag tcgcatcgc ggtc 1764
 <210> 6
 <211> 588

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 6

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ser Asp Trp Ser Gln Ala
 5 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Arg Ile Leu Ala Cys Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly
 20 25 30
 Pro Asp Trp Ser Gly Leu Tyr Gln His Glu Gly Asn Phe Leu Ala Gln
 35 40 45
 10 Gln Arg Leu Ala Val Val Ser Pro Leu Ser Gly Asp Gln Pro Leu Phe
 50 55 60
 Asn Glu Asp Arg Thr Val Val Val Val Ala Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
 65 70 75 80
 His Lys Asn Val Arg Lys Gln Phe Thr Gly Thr His Asn Phe Ser Thr
 15 85 90 95
 Gly Ser Asp Cys Glu Val Ile Met Pro Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Glu
 100 105 110
 Asn Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Val Phe Ala Phe Val Leu Tyr Asp
 115 120 125
 20 Thr Arg Asp Arg Thr Tyr Val Ala Ala Arg Asp Ala Ile Gly Val Asn
 130 135 140
 Pro Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Ser Asp Gly Ser Val Trp Ile Ala Ser
 145 150 155 160
 Glu Met Lys Ala Leu Asn Glu Asp Cys Val Arg Phe Glu Ile Phe Pro
 25 165 170 175
 Pro Gly His Leu Tyr Ser Ser Ala Gly Gly Gly Phe Arg Arg Trp Tyr
 180 185 190
 Thr Pro His Trp Phe Gln Glu Gln Val Pro Arg Thr Pro Tyr Gln Pro
 195 200 205
 30 Leu Val Leu Arg Glu Ala Phe Glu Lys Ala Val Ile Lys Arg Leu Met
 210 215 220
 Thr Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser

		485		490		495	
		Tyr Tyr Tyr Arg Met Ile Phe Glu Arg Leu Phe Pro Gln Asp Ser Ala					
		500		505		510	
		Arg Glu Thr Val Pro Trp Gly Pro Ser Ile Ala Cys Ser Thr Pro Ala					
5		515		520		525	
		Ala Ile Glu Trp Val Glu Gln Trp Lys Ala Ser Asn Asp Pro Ser Gly					
		530		535		540	
		Arg Phe Ile Ser Ser His Asp Ser Ala Ala Thr Asp His Thr Gly Gly					
		545		550		555	560
10		Lys Pro Ala Val Ala Asn Gly Gly Gly His Gly Ala Ala Asn Gly Thr					
		565		570		575	
		Val Asn Gly Lys Asp Val Ala Val Ala Ile Ala Val					
		580		585			
		<210>	7				
15		<211>	1743				
		<212>	DNA				
		<213>	Glicina max				
		<400>	7				
		atgtgtggta	ttcttgctgt	tcttggttgt	tctgatgact	ctcgagccaa	aaggggccgc 60
20		gtgcttgagc	tctctcgcag	attgaagcac	cgtggccctg	actggagtgg	gctccatcaa 120
		catggtgact	gctttttggc	acatcaacgg	ttagccatag	ttgatcctgc	ttctggggat 180
		caacctctct	ttaacgagga	caaatccgtc	attgttacgg	taaattggaga	gatttacaac 240
		catgaagagc	tcaggaaaca	gctgcctaata	cacaacttcc	gaactggaag	tgattgtgat 300
		gttattgcac	acctgtacga	ggaacatgga	gaagactttg	tggacatgct	ggatggatc 360
25		ttctcatttg	ttctactgga	cacccgtgac	aacagtttta	tagtggctcg	ggatgctatt 420
		ggggctcactt	ccttgtacat	tggatggggg	ttagatggct	ctgtttggat	ttcatcagaa 480
		atgaaaggcc	tgaatgatga	ttgtgaacac	tttgagtgtt	ttccacctgg	tcactgttac 540
		tctagcaaag	aaagagggtt	ccgcagatgg	tacaatcctc	cttggttctc	tgaggctatt 600
		ccatctgccc	cttatgatcc	tcttgtttta	agacacgcct	ttgagcaggc	agtcataaaa 660
30		aggttgatga	ctgatgtgcc	ttttgggtgt	ctactctctg	gaggtttggg	ctcttctttg 720
		gttgcatcca	tcacttctcg	ttacttggcc	aacacaaagg	ctgctgagca	gtggggatca 780
		aagttacatt	cattctgtgt	aggccttgag	ggctcaccag	atttgaagc	tgcaaaagag 840

gttgctgact atctaggcac tgtccacat gagtttacct tcaactgttca ggatggaata 900
 gatgccattg aagatgttat ctaccatatt gaacatatg atgtgactac aattagagca 960
 agcacaccta tgtttctcat gtctcggaag attaaatcac ttggtgtcaa atgggttate 1020
 tcaggagaag gatctgatga gatctttgga gggatattgt acttccacaa ggcacccaac 1080
 5 aaggaggagt tccacagaga aacatgccgc aagatcaaag cacttcacca atatgattgc 1140
 ttgcgagcca ataaatcaac atttgcttg ggtctagaag cccgtgtacc atttttggac 1200
 aaggcgttta tcaatgctgc aatgagtatt gaccctgagt ggaagatgat aaaaagagat 1260
 gaaggacgaa ttgagaagtg gattctgagg agagccttg atgatgaaga gcacccctat 1320
 ctgcccgaagc acattttata caggcagaaa gaacaattca gtgatggagt tggctatagt 1380
 10 tggattgatg gccttaaggc ccatgctgca aaacatgtga ctgaaaaat gatgcttaat 1440
 gctggtaaca ttaccccca caacaccca aaaaccaagg aagcatatta ctacagaatg 1500
 atctttgaga ggttcttccc tcagaactca gctaggctca ctgttcttgg aggagcaagt 1560
 gttgcatgta gcacagccaa agctgttgag tgggatgctg cttggtctaa caaccttgat 1620
 ccctctggta gagcagcact tggagtgcac atttcagcct atgaaaacca gaacaacaag 1680
 15 ggtgtagaaa ttgagaagat aatacctatg gatgctgctc cccttgggtg tgccatccag 1740
 ggc 1743
 <210> 8
 <211> 581
 <212> PRT
 20 <213> Glicina max
 <400> 8
 Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Arg Ala
 1 5 10 15
 Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly
 25 20 25 30
 Pro Asp Trp Ser Gly Leu His Gln His Gly Asp Cys Phe Leu Ala His
 35 40 45
 Gln Arg Leu Ala Ile Val Asp Pro Ala Ser Gly Asp Gln Pro Leu Phe
 50 55 60
 30 Asn Glu Asp Lys Ser Val Ile Val Thr Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
 65 70 75 80
 His Glu Glu Leu Arg Lys Gln Leu Pro Asn His Asn Phe Arg Thr Gly

	340		345		350
	Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys Glu Glu Phe His Arg Glu Thr				
	355		360		365
	Cys Arg Lys Ile Lys Ala Leu His Gln Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn				
5	370		375		380
	Lys Ser Thr Phe Ala Trp Gly Leu Glu Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp				
	385		390		395
	Lys Ala Phe Ile Asn Ala Ala Met Ser Ile Asp Pro Glu Trp Lys Met				
		405		410	415
10	Ile Lys Arg Asp Glu Gly Arg Ile Glu Lys Trp Ile Leu Arg Arg Ala				
		420		425	430
	Phe Asp Asp Glu Glu His Pro Tyr Leu Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg				
		435		440	445
	Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly				
15	450		455		460
	Leu Lys Ala His Ala Ala Lys His Val Thr Glu Lys Met Met Leu Asn				
	465		470		475
	Ala Gly Asn Ile Tyr Pro His Asn Thr Pro Lys Thr Lys Glu Ala Tyr				
		485		490	495
20	Tyr Tyr Arg Met Ile Phe Glu Arg Phe Phe Pro Gln Asn Ser Ala Arg				
		500		505	510
	Leu Thr Val Pro Gly Gly Ala Ser Val Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala				
		515		520	525
	Val Glu Trp Asp Ala Ala Trp Ser Asn Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg				
25	530		535		540
	Ala Ala Leu Gly Val His Ile Ser Ala Tyr Glu Asn Gln Asn Asn Lys				
	545		550		555
	Gly Val Glu Ile Glu Lys Ile Ile Pro Met Asp Ala Ala Pro Leu Gly				
		565		570	575
30	Val Ala Ile Gln Gly				
		580			

<211> 1785

<212> DNA

<213> *Xylella fastidiosa*

<400> 9

5 atgatttgatg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg taggtagacc gcgggatatc 60
acaagtttgt acaaaaaagc aggctcctgc aggaccatgt gttccatttt tggaaatcttc 120
aacctgcaac ccagtgacaa cctacagata ctgcgtcacc aagcattgga gtgctcgcaa 180
cggcaacggc atcgcggacc cgattggagc ggcggtttacg ttgatgtggg tgcgattctg 240
gtgcacgaac gtcttgctat cgttgatcca gctggcggtg cccagccact gctctccgag 300
10 gatggcacc tggcgttggc ggtcaacggc gaaatctata accacgctgt actcaaagga 360
acattgcagc agccctatgc gttccaaact cattctgatt gcgaagtgat taatgcgctt 420
taccggaag aaactccaac ctcgtttctg aatcgcttaa atgggatttt tgcattcgta 480
ttatgggaca agactaccgg acgtggcctc atcgcacgcg atccaatggg tgtggtgccg 540
ctgtactggg ggcacgatca ggacggctgc ttacgtgtcg cgtcagagat gaaagcattg 600
15 gttgagcatt gctccgacgt tgcacaattc ccacccggcc attggtacga caccacaacg 660
ggcacgctgg tgaagtatta cgaacgcccc tggaaaaact attctgcagt ggaaggagtg 720
caggtctcac tacaggaact gcgtgaagcg ttcgagcggg ccgtccatcg tcaactcatg 780
acagatgttc catacgggtg actgctttct ggtggattgg attcttccct ggtggctgcg 840
gtggccgcac gctacgcacg ccatcgcacg gaaaccaatg atcagagcga agcatggtgg 900
20 ccacgtctgc actcatttgc gattggactg aaagactcgc cagatttgag tgcggcgaac 960
gtggctgctg aggcgttgaa taccgtccac catcgtttct agtacacctt ccaggagggg 1020
ctggatgttc tacctgaagt gattcgtcac attgaaactt acgatgtcac gacgattcgc 1080
gcatctacac caatgttctt gctggcacgt cgcattaagg cgatgggagt gaagatggtc 1140
ttgtcaggtg aaggtagcga tgaaatthtt ggcggttacc tgtacttcca caaagcggcg 1200
25 aacgcacgcg agttccacga agaattggtc cgtaagctca acgccctgta ttactacgac 1260
tgcttgcgcg ccaacaaagc gatgatggcg tgggggtgctg agccgcgcgt gccgtttttg 1320
gaccgtgaat ttctcgatgt ggctatgcgg atggatgctc agcataagat ggtcgacaag 1380
accagcaacg gccacaacg gatggagaaa ggcacctctc gtgcagcgtt tgacggctat 1440
ttgccgccat caatcctgtg gcgacagaag gagcagttca gtgatggtgt tggctacggt 1500
30 tggatcgacg gactgaaagc acacgctgaa acgcaagtgt ctgaccatgc gctggcaact 1560
gccgagacac gtttccaggt gaatcctccc cagaccaaag aagcctatta ctaccgcagc 1620
atatttgagc gcttcttccc aagcccggcg gcggctgaga cggtagccgg cggtaaatca 1680

attgcctggt cctcaccggc ggcgattgcc tgggatgcca gcttcgccac aatggctgac 1740
 ccatccggtc gtgcagtcag cggggttcat caacaagcac tgctg 1785
 <210> 10
 <211> 1779
 5 <212> DNA
 <213> *Xanthomonas campestris*
 <400> 10
 atgatttggt acaaatgcag cctcgtgctg agcttttttg taggtagacc gcgaccgggt 60
 cgcgctcag cagtcgctgt cgttaccatg tgttccatct tcggtatctt cggcctgcaa 120
 10 cccggcgagc acctgcaggc cctgcgcccg caggccctgg aatgttcgca gcggaacgc 180
 catcgccggc cggactggag cggcgtgtac gtcgatgccg gtgccatcct ggtgcacgag 240
 cgctggcca tcgtcgacct ggcgggctgt tcgcagccgc tgttgcgga ggacggcagc 300
 ctggcgttgg cagtcaacgg cgagatctat aaccatcgcg aactcaaggc cgagctactg 360
 cagccgtacg cttttcagac cggctcggac tgcgaagtga tcaacgcgct gtaccgcgaa 420
 15 gatgcgccgg cctcctatct caaccgcctc aatggcctct tcgcctttgc gttgtgggac 480
 aaggccggcg ggcgggtgat catcgccgac gaccggattg gcgtgggtgc gttgtactgg 540
 ggacacgacc gcgaaggccg tctgcgctgt gcgtccgaac tcaagtcgct ggtggacgat 600
 tgcgccgatg ctgcgcagtt tccgcctggt cattggtacg acagcggccac cggcgcattg 660
 agccgctact acgagcgtc gtggcgcgaa tacagcgaag tggaaaatgt gcaggtgccg 720
 20 ctgcaggaac tgcgcgaggc gttcgagcgc gcggtgcatc gccagctgat gaccgacgtg 780
 ccctacggtg tgctgctgtc cgggtggcctg gattcgtcgt tgggtggcggc agtggcccg 840
 cgctacgcgc ggcacgtgat cgaagagaac gacaccaccg aagcctgggt gccgcgcctg 900
 cattccttgc caatcggcct gaccggctcg ccggatctgg ccgctgccga agtggccgcc 960
 gccgcgctcg gtaccgtgca ccacggcttc gaatacagct ttgaagaagg cctggatgca 1020
 25 ttgccggaag tgatccgcca catcgaaacc tacgacgtca ccacgattcg tgcgtccacg 1080
 ccgatgttcc tgctggcgcg gcgcatcaag gcgatgggcg tcaagatggt gctgtccggc 1140
 gaaggcagcg acgagatctt cgggtggctac ctgtacttcc acaaggcacc gaacgcccgc 1200
 gaattccacg aagaactggt gcgcaagctc gatgcgctca acaactacga ttgcctgcgc 1260
 gccacaagt cgatgatggc ctggggcgtg gaaccgcgcg tgccgttcct ggatcgcgaa 1320
 30 ttcttgagc tggcgatgcg catggacgcg cgcttcaaga tgatcgaaa gaccagcacc 1380
 ggtgccaccc gcatcgagaa gggcatcttg cgcgaggcat ttgccggcta tctgccgaa 1440
 tcgatcctgt ggcggcagaa ggagcaattc agcgatggcg ttggttatgg ctggatcgac 1500

ggctcaagg cacatgccgc cgcgcacgtg agcgaccgcg aactcgcagc ggccgaccgg 1560
 cgcttcccgg tgaaccogcc gcagaccaag gaagcctatt tctaccgcag tctgttccgag 1620
 cagttcttcc ccagccaggc cgctgcggag acggtgccgg gtggtaaadc catcgcgtgt 1680
 tcgtcgcgga cggccattgc ctgggacgcg agctttgagg cgatggccga tccgtcgggc 1740
5 cgtgcgattg ccggcgtgca cgcgacggcg ttggcgtcc 1779
 <210> 11
 <211> 1941
 <212> DNA
 <213> Bacillus halodurans
10 <400> 11
 atgatttgtg acaaatgcag cctcgtgagg agcttttttg taggtagacc gcgggatadc 60
 acaagtttgt acaaaaaagc aggtccttgc aggaccatgt gtggaattac aggctgggta 120
 gattggcgac gcaacttgca aaatgagacg gaaacgatca aacagatggc ggaaacgcaa 180
 acacatcgag ggcccgatga tttgaacgtt tggacagaga agcatgctgc cttaggccac 240
15 tcgaggctca ttgtcgttga tccggaaggc ggttgcagc cgatgatgag ggagaggaat 300
 ggcaaacgct atacgatcgt gtataacggc gaattataca atacagaaga tttacggaaa 360
 gagcttatag taaaaggtta ccaatttcaa ggccattcgg atacggaagt attactcgtg 420
 tcttatatcg aatggggta ccaatgtgtg gagaagttca atggcatttt tgcgtttgag 480
 atttgaatg ataaagatca gagcttgttt atggcccggc accgattagg ggtaaagccg 540
20 ctattttata ctgttcgcca tggattttta ctttttcaa ctgagataaa agcgctgctt 600
 gctcatcctg aaatcgagcc ggttcttacc gaagaagggc tatcggaagt gctcgggctt 660
 gggccatcac gttcaccggg taatggcgtt tttgatgata ttcaagagtt gcgaccagct 720
 catcttttga catacgatcg caatggggca aaagtgagcc gttattggag attaaaatca 780
 atggctcatt ctgaagatgc gatggaaaag gccgccatc ttcgcgactt attagaagat 840
25 actgtcgaac gtcagctatt tgcagatggt ccagttggaa tgtttcttcc ggggtggagtc 900
 gattcgagtg cttaacggc aattgcggcg ctgatttacg agcgagaagg gaagggcctg 960
 attcggacgt actcgattga ttatgacgaa aatgataagt attttaaagc gaatgacttt 1020
 caaccgaatg ccgatggacc ttgggttgaa aaagtttcaa ctacttttcg aacgaaccac 1080
 cacaatgctg tcatctcgat cgaggagtgt gctaataat taaagcgagc ggtagagctt 1140
30 cgtgacttac ctggaatggc cgatgtagac tcttcattgt attggttttg taagcaaatc 1200
 aaaaaagatg ttaccgttgg cttatcgggt gaatgtgctg acgaaatfff tgggtgggtat 1260
 ccttgggtcc ataagccaga ggtcatgaat tttaatgggt ttccttggat gagatcagcg 1320

gatgaacgtc aggagcttct tcatgaacga tggcgccaaa agttaaattt gcccaaatac 1380
gttcatgatac gttataaaga aacgattgcc gaaacgcctc gcttcgaaga ggacacaccg 1440
gaagaagcgc gacgcagggg aatttcgtat ttgaacatgg tctggtttat gacaacgctt 1500
cttgatcggg aggatcgaat gagcatggga gcgagcttag aagtgcgagt tccattttct 1560
5 gaccaccgaa ttgtagaata cgcttggaac attccgtggg aaattaaaca attcggaggg 1620
agagagaagg gcattttacg aaaagcgttg gaaggcatcc tcccagatga agtggtatac 1680
cggaaaaaaaa gtccttatcc gaaaacgcac catccaaaat acacgaaaat ggtccagcaa 1740
gagatggaac gaattctcgg tcaaagcgat agccccctct ttgatgtagt gaaccggaaa 1800
aagttaaaag agttaaccga aactgggtggc aaggcattaa cgacacctta ttttgggcag 1860
10 cttatgacag gccgcagct ccttgcccac ttcacccaaa tggagcattg gcttaagcat 1920
tacaatatca aattaattgg t 1941
<210> 12
<211> 1869
<212> DNA
15 <213> *Oryza sativa*
<400> 12
atgattttgtg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg taggtagacc gcgggatatac 60
acaagtttgtg acaaaaaagc aggcctctgc aggaccatgt gtggcatcct cgccgtgctc 120
ggcgtcgcag acgtctccct cgtaagcgc tcccgcataca tcgagctatc ccgccggtta 180
20 cgtcatagag gccctgattg gagtggata cactgctatc aggattgcta tcttgcacac 240
cagcggttgg ctattgttga tcccacatcc ggagaccagc cgttgtacaa tgaggacaaa 300
tctgttgttg tgacggtgaa tggagagatc tataaccatg aagaattgaa agctaacctg 360
aaatctcata aattccaaac tgctagcgat tgtgaagtta ttgctcatct gtatgaggaa 420
tatggggagg aatttggtga tatgttggat gggatgttcg cttttgttct tcttgacaca 480
25 cgtgataaaa gcttcattgc agcccgtgat gctattggca tttgtccttt atacatgggc 540
tggggctctg atggttcggg ttggttttcg tcagagatga aggcattaag tgatgattgc 600
gagcgattca tctcctccc ccctgggcac ttgtactcca gcaaacagg tggcctaagg 660
agatggtaca acccaccatg gttttctgaa agcattccct ccaccccgta caatcctctt 720
cttctccgac agagctttga gaaggctatt attaagaggc taatgacaga tgtgccattt 780
30 ggtgttctct tgtctggtgg actggactct tctttggttg catctgttgt ttcgcccac 840
ttggcagagg caaaagttgc cgcacagtgg ggaacaaac tgcatacatt ttgcattggt 900
ttgaaaggtt ctctgatct tagagctgct aaggaagttg cagactacct tgggtactgtt 960

catcacgaac tccacttcac agtgcaggaa ggcattgatg cactggagga agtcatttac 1020
 catgttgaga catatgatgt aacgacaatt agagcaagca cccaatggt cttgatgtca 1080
 cgtaaaatta aatctttggg ggtgaagatg gttctttcgg gagaaggttc tgatgaaata 1140
 tttggcgggt acctttatct tcacaaggca ccaaacaaga aggaattcca tgaggaaaca 1200
 5 tgtcggaaga taaaagccct tcatttataat gattgcttga gagcgaacaa atcaacttct 1260
 gcatgggggt ttgaggcccg tgttcctggt cttgacaaaa acttcatcaa ttagctatg 1320
 gacattgatc ctgaatggaa aatgataaaa cgtgatcttg gccgtattga gaaatgggtt 1380
 ctccggaatg catttgatga tgaggagaag ccctatttac ctaagcacat tctatacagg 1440
 caaaaggagc aattcagtga tgggtgttggg tacagttgga ttgatggatt gaaggatcat 1500
 10 gcaaatgaac atgtatcaga ttccatgatg atgaacgcta gctttgttta ccagaaaaac 1560
 actccagtta caaaagaagc gtactattat aggacaatat tcgagaaatt ctttccaag 1620
 aatgctgcta ggttgacagt acctggaggt cctagcgtcg cgtgcagcac tgctaaagct 1680
 gttgaatggg acgcagcctg gtccaaaaac cttgatccat ctggctctgc tgctcttgg 1740
 gttcatgatg ctgcatatga agatactcta caaaaatctc ctgcctctgc caatcctgctc 1800
 15 ttggataacg gctttgttcc agcccttggg gaaagcatgg tcaaaaccgt tgcttcagcc 1860
 actgccgtt 1869
 <210> 13
 <211> 1764
 <212> DNA
 20 <213> *Galdieria sulphuraria*
 <400> 13
 atgatttgatg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg taggtagacc gcgaccgggt 60
 cgcgccctcag cagtcgctgt cgttaccatg tgtgggattc ttgcgggtgtt gggctcgtcg 120
 ttaccggctcg aagagcttag agagttggtt aaaagctgca ccaaaaaact atatcacaga 180
 25 ggtccagatg aagaacaata tttcattagt gaagatgggt ggtgtggtt aggctttgcc 240
 aggttgaaga ttgttgatcc tgagcacggt gtccagccta tgttcaacga ccaacggaca 300
 gtttgagatg tcaactatgg cgagctttac aaccatgaag agatccgaaa aacggaattg 360
 aacaatatga cactccattc tcattctgac tgcgaaataa tgatacctt gtatgagaaa 420
 tatgtttcta gtcagcgtta tgatcatgac attcaatag tttataatct tctccgtgga 480
 30 gtctttgctt cttgctggt tgatttgaac cgtgggtttt tcatggctgg aagagatcct 540
 atcggggctc gagctctttt ttatgggaca agtaaagatg gtgctggtt gtttgcttca 600
 gaggcaaaag caattgtgga tgtttgtgat tatgtgacag cattcatacc aggtacctt 660

gtgaaaggat acagaggccg cgaacaagca ttttcttta cgagatatta cgaaccagtg 720
 tactggcatg atcactggat gccggttct ccagttgact atcaactttt acatgacacc 780
 tttgtgttgt cttgtaagcg tcgtttaatg tccgacgtgc ctattggagt atttatctct 840
 ggtggttgg gttcttctct tgtggcctcc gtcgccaac gcttactgga tcccaactat 900
 5 gattttcatt ctttgcttg tggcttgaa ggagcaccag atgttgctgc agcgcaaaga 960
 gttgccgatt tcttaggaac aaagcaccac gtattaacat ttactgtgga ggagggatc 1020
 caagcactag accaagtaat atatcacttg gaaacgtacg atgttaccac agttagagca 1080
 tcgacgccga tgtatttgtt atcaggttg tgcaaaaagt atgtcaaagt agtgttatca 1140
 ggtgaaggag cagatgaaat cttcggtgga tatctctatt tccacaatgc accaaatgag 1200
 10 attgcatttc atcaagaagt tgctcgcga gtgaaacttt tatacacagc cgacgtattg 1260
 cgtggagata gagcaacggc agcacaagt ttagaacttc gagttccgtt tcttgataga 1320
 gactttctgg atgttgcaat gagtattcat ccgctgaaa aggttacttc taagcataga 1380
 atcgagaaat atatcattcg ctatgccttt tccaaggagt tttgtgtga agagtatctt 1440
 cctgacgata ttctttggag acaaaaagaa cagttttcgg atggcgtggg ctatagctgg 1500
 15 atcgatggtt taaaggcgtg ttgtgaaaag gccgtttccg atgcagactt gcaaaatgcc 1560
 gctcagcgtt ttccgcacga tactccaaca accaaagagg catatgttta ccgagctata 1620
 ttcgaaaaac attttgggaa ttgcaaggca gtacaaggtc ttcgtgaatc agttgcaaga 1680
 tgggtaccta tgtggagtga cagcacggat cctagcggtc gtgcacaaaa agttcatgtg 1740
 gctgcatatt caaatggagg agac 1764
 20 <210> 14
 <211> 1905
 <212> DNA
 <213> *Galdieria sulphuraria*
 <400> 14
 25 atgtgttgc ctccttacct cctgatggta tctagtatct accaactgac actatattgc 60
 ttctctttac atacgtatct tgctcgtgc cttctcccta gtggtgacca gtgttactca 120
 catagtcttt gctcatttca ttgtaatgca gataccaagc ggggtaccag atctgagctc 180
 ccgcgggata tcacaagttt gtacaaaaaa gcaggctcct gcaggacat gtgtgggatt 240
 cttgcggtgt tgggctcgtc gttaccggtc gaagagetta gagagttggt taaaagctgc 300
 30 accaaaaaac tatatcacag aggtccagat gaagaacaat atttcattag tgaagatggg 360
 tgggtgtggt taggctttgc caggttgaag attggtgatc ctgagcacgg tgtccagcct 420
 atgttcaacg accaacggac agtttgagt gtcactaatg gcgagcttta caacatgaa 480

gagatccgaa aaacggaatt gaacaatatg acactccatt ctcattctga ctgcgaaata 540
 atgatacctt tgtatgagaa atatgtttct agtcagcggt atgatcatga cattcaatat 600
 gttataatc ttctccgtgg agtccttgct tcttgctgg ttgattgaa acgtggtttt 660
 ttcatggctg gaagagatcc tateggggtc cgagctcttt tttatgggac aagtaaagat 720
 5 ggtgctgttt ggtttgcttc agaggcaaaa gcaattgtgg atgtttgtga ttatgtgaca 780
 gcattcatac caggtacctt tgtgaaagga tacagaggcc gcgaacaagc attttctttt 840
 acgagatatt acgaaccagt gtactggcat gatcactgga tgccggtttc tccagttgac 900
 tatcaacttt tacatgacac ctttgtgtg tcttgtaagc gtcgtttaat gtcgcacgtg 960
 cctattggag tatttatctc tgggtggttg ggttcttctc ttgtggcctc cgtcgcaaaa 1020
 10 cgcttactgg atcccaacta tgattttcat tcttttgctt gtggtcttga aggagcacca 1080
 gatgttgctg cagcgcaaag agttgccgat ttcttaggaa caaagcacca cgtattaaca 1140
 tttactgtgg aggagggtat ccaagcacta gaccaagtaa tatatcactt ggaaacgtac 1200
 gatgttacca cagttagagc atcgacgccg atgtatttgt tadcaggttt gtgcaaaaag 1260
 tatgtcaaag tagtgttate aggtgaagga gcagatgaaa tcttcggtgg atatctctat 1320
 15 ttccacaatg caccaaatga gattgcattt catcaagaag ttgttcgccg agtgaactt 1380
 ttatacacag ccgacgtatt gcgtggagat agagcaacgg cagcacaag tttagaactt 1440
 cgagttccgt ttcttgatag agactttctg gatgttgcaa tgagtattca tccgcgtgaa 1500
 aaggttactt ctaagcatag aatcgagaaa tatatcattc gctatgcctt ttccaaggag 1560
 ttttgtggtg aagagtatct tcttgacgat attccttggg gacaaaaaga acagttttcg 1620
 20 gatggcgtgg gctatagctg gatcgatggt ttaaaggcgt attgtgaaaa ggccgtttcc 1680
 gatgcagact tgcaaaatgc cgctcagcgt tttccgcacg atactccaac aaccaagag 1740
 gcatatgttt accgagctat attcgaaaaa cattttggga attgcaaggc agtacaaggt 1800
 cttcgtgaat cagttgcaag atgggtacct atgtggagtg acagcacgga tcctagcgg 1860
 cgtgcacaaa aagttcatgt ggctgcatat tcaaatggag gagac 1905
 25 <210> 15
 <211> 1851
 <212> DNA
 <213> *Galdieria sulphuraria*
 <400> 15
 30 atggtatcta gtatctacca actgacacta tattgcttct ctttacatac gtatcttget 60
 cgatgccttc tcctagtgt tgaccagtgt tactcacata gtctttgctc atttcattgt 120
 aatgcagata ccaagcggga gctcgacgtc cctcagcagt cgctgtgcga taccatgtgt 180

gggattcttg cgggtgtggg ctcgtcgta ccggtcgaag agcttagaga gttggttaa 240
 agctgcacca aaaaactata tcacagaggt ccagatgaag aacaatattt cattagtgaa 300
 gatgggtggt gtggtttagg ctttgccagg ttgaagattg ttgatcctga gcacgggtgc 360
 cagcctatgt tcaacgacca acggacagtt tggagtgtca ctaatggcga gctttacaac 420
 5 catgaagaga tccgaaaaac ggaattgaac aatatgacac tccatttca ttctgactgc 480
 gaaataatga tacctttgta tgagaaatat gtttctagtc agcgttatga tcatgacatt 540
 caatatgttt ataactttct ccgtggagtc tttgcttctt gcctggttga tttgaaacgt 600
 ggttttttca tggctggaag agatcctatc ggggtccgag ctctttttta tgggacaagt 660
 aaagatggtg ctgtttggtt tgcttcagag gcaaaagcaa ttgtggatgt ttgtgattat 720
 10 gtgacagcat tcataccagg tacctttgtg aaaggataca gaggccgcga acaagcattt 780
 tcttttacga gatattacga accagtgtac tggcatgatc actggatgcc ggtttctcca 840
 gttgactatc aacttttaca tgacacctt gtgttgcctt gtaagcgtcg tttaatgtcc 900
 gacgtgccta ttggagtatt tatctctggt ggtttgggtt cttctcttgt ggcctccgtc 960
 gccaaacgct tactggatcc caactatgat tttcattctt ttgcttggg tcttgaagga 1020
 15 gcaccagatg ttgctgcagc gcaaagagtt gccgatttct taggaacaaa gcaccacgta 1080
 ttaacattta ctgtggagga gggatccaa gcactagacc aagtaatata tcacttggaa 1140
 acgtacgatg ttaccacagt tagagcatcg acgccgatgt atttgttatc aggtttgtgc 1200
 aaaaagtatg tcaaagtagt gttatcaggt gaaggagcag atgaaatctt cgggtggatat 1260
 ctctatttcc acaatgcacc aatgagatt gcatttcac aagaagttgt tcgccgatg 1320
 20 aaacttttat acacagccga cgtattgcgt ggagatagag caacggcagc acaaagtta 1380
 gaacttcgag ttccgtttct tgatagagac tttctggatg ttgcaatgag tattcatccg 1440
 cgtgaaaagg ttacttctaa gcatagaatc gagaaatata tcattcgcta tgccttttcc 1500
 aaggagtttt gtggtgaaga gtatcttctt gacgatattc tttggagaca aaaagaacag 1560
 ttttcggatg gcgtgggcta tagctggatc gatggtttaa aggcgtattg tgaaaaggcc 1620
 25 gtttccgatg cagacttgca aatgccgct cagcgttttc cgcacgatac tccaacaacc 1680
 aaagaggcat atgtttaccg agctatattc gaaaaacatt ttgggaattg caaggcagta 1740
 caaggtcttc gtgaatcagt tgcaagatgg gtacctatgt ggagtgcag cacggatcct 1800
 agcggtcgtg cacaaaaagt tcatgtggct gcatattcaa atggaggaga c 1851
 <210> 16
 30 <211> 1851
 <212> DNA
 <213> Galdieria sulphuraria

<400> 16

atggtatcta gtatctacca actgacacta tattgcttct ctttacatac gtatcttgct 60

cgatgccttc tccctagtggt tgaccagtggt tactcacata gtctttgctc atttcattgt 120

aatgcagata ccaagcggga gctcgacgtc cctcagcagt cgctgtgcca taccatgtgt 180

5 gggattcttg cgggtgtggg ctctcgctta ccggctgaag agcttagaga gttgggttaa 240

agctgcacca aaaaactata tcacagaggt ccagatgaag aacaatattt cattagtgaa 300

gatgggtggt gtggtttagg ctttgccagg ttgaagattg ttgatcctga gcacgggtgc 360

cagcctatgt tcaacgacca acggacagtt tggagtgta ctaatggcga gctttacaac 420

catgaagaga tccgaaaaac ggaattgaac aatatgacac tccattctca ttctgactgc 480

10 gaaataatga tacctttgta tgagaaatat gtttctagtc agcgttatga tcatgacatt 540

caatatgttt ataactttct ccgtggagtc tttgcttctt gcctgggtga tttgaaacgt 600

ggttttttca tggctggaag agatcctatc ggggtccgag ctctttttta tgggacaagt 660

aaagatggtg ctgtttggtt tgcttcagag gcaaaagcaa ttgtggatgt ttgtgattat 720

gtgacagcat tcataccagg tacctttgtg aaaggataca gaggccgcca acaagcattt 780

15 tcttttacga gatattacga accagtgatc tggcatgatc actggatgcc ggtttctcca 840

gttgactatc aacttttaca tgacacctt gtgttgctt gtaagcgtcg tttaatgtcc 900

gacgtgccta ttggagtatt tatctctggt ggtttgggtt cttctctgtt ggctccgctc 960

gccaaacgct tactggatcc caactatgat tttcattctt ttgcttgtgg tcttgaagga 1020

gcaccagatg ttgctgcagc gcaaagagtt gccgattct taggaacaaa gcaccacgta 1080

20 ttaacattta ctgtggagga gggatccaa gcactagacc aagtaatata tcacttgga 1140

acgtacgatg ttaccacagt tagagcctc acgccgatgt atttgttacc aggtttgtgc 1200

aaaaagtagt tcaaagtagt gttatcaggt gaaggagcag atgaaatctt cgggtggatat 1260

ctctatttcc acaatgcacc aatgagatt gcatttcac aagaagttgt tcgccgagtg 1320

aaacttttat acacagccga cgtattgcgt ggagatagag caacggcagc acaaagtta 1380

25 gaacttcgag ttccgtttct tgatagagac tttctggatg ttgcaatgag tattcatccg 1440

cgtgaaaagg ttacttctaa gcatagaatc gagaaatata tcattcgcta tgccttttcc 1500

aaggagtttt gtgggtgaaga gtatcttctt gacgatattc tttggagaca aaaagaacag 1560

ttttcggatg gcgtgggcta tagctggatc gatggtttaa aggcgtattg tgaaaaggcc 1620

gtttccgatg cagacttga aatgccgct cagcgtttc cgcacgatac tccaacaacc 1680

30 aaagaggcat atgtttaccg agctatatc gaaaaacatt ttgggaattg caaggcagta 1740

caaggctctc gtgaatcagt tgcaagatgg gtacctatgt ggagtgcag cacggatcct 1800

agcggctcgt cacaaaaagt tcatgtggct gcatattcaa atggaggaga c 1851

<210> 17
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 5 <400> 17
 atgatttgtg acaaatgcag cctcgtgagg agcttttttg taggtagacc gcggaccggt 60
 cgcgccctcag cagtcgctgt cgttaccatg tgtggtatct ttgcagcctt caagcatgaa 120
 gatattcaca acttcaaacc aaaagctcta caactatcta aaaaaatcag acaccgtggc 180
 ccagattggg caggaaatgc cgttatgaat tccaccattt tcggtcacga gaggttggct 240
 10 attgttgggt tagactcggg tgcccagcca atcactcag ctgatggcga atatatgctt 300
 ggcgttaatg gtgagatcta caaccacatc caactaaggg agatgtgctc tgattacaag 360
 tttcaaactt tcagtgactg tgaaccatc ataccgttat atttgaaca tgatatcgat 420
 gctccaaaat atctggacgg tatgttcgca tttgtctgt atgattcaa gaaagaccgt 480
 attgtcgtc caagagacc tatcgggtgt gtcactttat acatggggcg ttcttctcag 540
 15 tctccagaga ccgtttatth tgctccgaa ttaaaatgct taactgacgt ttgtgacagt 600
 atcatttcgt tccctcctgg tcatgtctac gattctgaaa cggacaagat tactcgttac 660
 tttaccccag actggttggg tgaagagcgt atccatcca cccagttga ctaccatgct 720
 atcagacaca gtttagaaaa ggccgttaga aagaggctaa tggctgaagt tccatcgggt 780
 gttcttctat ccggtgggct ggactcttct ttgattgctg cgattgctgc tcgtgaaacg 840
 20 gaaaaagcta atgctgatgc taacgaagac aacaatgttg acgagaagca acttgcaggt 900
 atcgatgacc aaggccatct acacacatcc ggttggctc gtttgcattc gtttgcgatt 960
 ggtctaccaa atgcacctga tttacaagcg gctagaaaag tcgccaatt cattggttct 1020
 atccaccatg aacacacttt tacattacaa gaaggttgg atgctttgga cgacgtgatc 1080
 taccatttgg aaacttacga cgttaccact atcagagctt ctacaccaat gttcttacta 1140
 25 tctagaaaga ttaaggccca aggtgtcaaa atggttcttt ctggtgaagg ctcggacgaa 1200
 atattcgggtg gctatctata tttcgcacaa gcaccttctg ctgcagaatt tcacaccgaa 1260
 tctgtgcaac gtgtcaagaa cttgcatttg gcagattggt tgagagctaa taagtccacg 1320
 atggcttggg gtctagaagc tcgtgttccc ttcttagaca aagacttttt gcagctatgt 1380
 atgaacattg atccaaatga aaagatgatc aagccaaagg aaggacgtat cgaaaaatac 1440
 30 attttaagaa aggcatcga cactacagat gaaccagatg ttaagccata cctacctgaa 1500
 gaaatcttat ggagacaaaa ggaacaatth tccgatgggt ttggctactc atggattgac 1560
 ggccaaagag aactgctga aaggccatt tctgacgcca tgtttgcaa tccaaaggct 1620

gattggggcg acgatattcc aaccaccaaa gaagettact ggtacaggct gaagtttgat 1680
 gcttggtttc ctcaaagac tgcggcagac actgtcatga gatggattcc aaaggccgat 1740
 tggggttggtg ccgaagatcc ttcaggtaga tacgcaaaa tacacgaaa gcacgtcagt 1800
 gct 1803

5 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>

10 <223> Seqüência do iniciador sintético
 <400> 18
 gcagucgctg ucgtuacat g 21
 <210> 19
 <211> 20

15 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Seqüência do iniciador sintético
 <400> 19

20 gcgaguaccg cugggtucta 20
 <210> 20
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

25 <220>
 <223> Seqüência do iniciador sintético
 <400> 20
 gctcctgcag gaccatgtgt tccatttttg gaatcttca 39
 <210> 21

30 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 21
 ctgggtctcg agctacagca gtgcttggtg atgaacc 37
5 <210> 22
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
10 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 22
 cccttttat aatgccaaact ttgtacaaaa aagcaggctc ctgcaggacc atg 53
 <210> 23
 <211> 48
15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 23
20 ggggtcttat aatgccaaact ttgtacaaga aagctggggtc tcgagcta 48
 <210> 24
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
25 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 24
 gctcctgcag gaccatgtgt ggaattacag gctggg 36
 <210> 25
30 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 25
 ctgggtctcg agctaaccaa ttaatttgat attgtaatgc ttaagcc 47
5 <210> 26
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
10 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 26
 cccttttat aatgccaact ttgtacaaaa aagcaggctc ctgcaggacc atg 53
 <210> 27
 <211> 48
15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 27
20 ggggtcttat aatgccaact ttgtacaaga aagctgggtc tcgagcta 48
 <210> 28
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
25 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 28
 gctcctgcag gaccatgtgc ggcacccctcg c 31
 <210> 29
30 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 29
 ctgggtctcg agctagacag ctgtggctga agcaac 36
5 <210> 30
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
10 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 30
 cccttttat aatgccaact ttgtacaaaa aagcaggctc ctgcaggacc atg 53
 <210> 31
 <211> 48
15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 31
20 ggggtcttat aatgccaact ttgtacaaga aagctgggtc tcgagcta 48
 <210> 32
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
25 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 32
 gctcctgcag gaccatgtgc ggcatacttg ctgtg 35
 <210> 33
30 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 33
 ctgggtctcg agctatccct cgatggcaac gc 32

5 <210> 34
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>

10 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 34
 ccccttttat aatgccaact ttgtacaaaa aagcaggctc ctgcaggacc atg 53
 <210> 35
 <211> 48

15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 35

20 ggggtcttat aatgccaact ttgtacaaga aagctgggtc tcgagcta 48
 <210> 36
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

25 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 36
 gctcctgcag gaccatgtgt ggcacccctcg ccgt 34
 <210> 37

30 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 37
 ctgggtctcg agctaaacgg cagtggctga agca 34
5 <210> 38
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
10 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 38
 cccttttat aatgccaact ttgtacaaaa aagcaggctc ctgcaggacc atg 53
 <210> 39
 <211> 48
15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 39
20 ggggtcttat aatgccaact ttgtacaaga aagctgggctc tcgagcta 48
 <210> 40
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
25 <220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 40
 gtcctgcag gaccatgtgt ggtattcttg ctgttcttgg 40
 <210> 41
30 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

	<220>		
	<223>	Seqüência do iniciador sintético	
	<400>	41	
		ctgggtctcg agctagccct ggatggcaac acc	33
5	<210>	42	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência Artificial	
	<220>		
10	<223>	Seqüência do iniciador sintético	
	<400>	42	
		ctgggtctcg agctagccct ggatggcaac acc	33
	<210>	43	
	<211>	48	
15	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência Artificial	
	<220>		
	<223>	Seqüência do iniciador sintético	
	<400>	43	
20		ggggtcttat aatgccaact ttgtacaaga aagctgggtc tcgagcta	48
	<210>	44	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência Artificial	
25	<220>		
	<223>	Seqüência do iniciador sintético	
	<400>	44	
		cctctagatg tgcggcatac ttgctg	26
	<210>	45	
30	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência Artificial	

<220>
 <223> Sequência do iniciador sintético
 <400> 45
 cgaattctat ccctcgatgg caacg 25
 5 <210> 46
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Iniciador Sintético
 <400> 46
 tctagacat gtccggcata cttgctg 27
 <210> 47
 <211> 23
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador Sintético
 <400> 47
 20 tgcagaattc tatecctcga tgg 23
 <210> 48
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Iniciador Sintético
 <400> 48
 gcagtcgctg tcgttaccgg gcatcatgtg tggcatc 37
 <210> 49
 30 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Sintético

<400> 49

gcgagtaccg ctgggttcta acgtactctc gtcagaccgc g

41

REIVINDICAÇÕES

1. Semente de milho transgênica com um nível de proteína aumentado, caracterizada pelo fato de que compreende em seu genoma um constructo de DNA heterolóloga compreendendo um promotor operavelmente ligado a um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de asparagina sintetase heterólogo, em que a referida semente tem um nível de proteína aumentado relativo ao nível de proteína de uma semente da mesma variedade não contendo o referido constructo de DNA em seu genoma, em que o referido polinucleotídeo compreende uma seqüência de ácido nucléico selecionada a partir do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácido nucléico compreendendo uma seqüência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17;

(b) uma seqüência de ácido nucléico que codifica a seqüência de polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8; e

(c) uma seqüência de ácido nucléico da que hibridiza para a seqüência (a) ou (b) ou um complemento desta sob condições de severidade alta de cerca de 0,2 x SSC e 65°C.

2. Semente de milho transgênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido polipeptídeo de asparagina sintetase heterólogo compreende SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

3. Semente de milho transgênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido polinucleotídeo compreende a seqüência de ácido nucléico de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17.

4. Semente de milho transgênica de acordo com a reivindicação

1, caracterizada pelo fato de que o referido polipeptídeo de asparagina sintetase heterólogo é um polipeptídeo de *AsnS2* de milho.

5 5. Semente de milho transgênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido o promotor é um promotor de actina 1 de arroz.

10 6. Planta de milho transgênica com um nível de asparagina aumentado, caracterizada pelo fato de que compreende em seu genoma um constructo de DNA heteróloga compreendendo um promotor operavelmente ligado a um polinucleotídeo codificando uma asparagina sintetase heteróloga, em que a referida planta tem nível de asparagina aumentado relativo ao nível de asparagina de uma planta da mesma variedade não contendo a referido constructo de DNA em seu genoma, em que o referido polinucleotídeo codificando uma asparagina sintetase compreende uma seqüência de ácido nucléico selecionada a partir do grupo consistindo em:

15 (a) uma seqüência de ácido nucléico compreendendo a seqüência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17;

20 (b) uma seqüência de ácido nucléico que codifica a seqüência de polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8; e

25 (c) uma seqüência de ácido nucléico da que hibridiza para a seqüência de (a) ou (b) ou um complemento desta sob condições de severidade alta de cerca de 0,2 x SSC e 65°C.

7. Planta de milho transgênica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a referida asparagina sintetase compreende SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

30 8. Planta de milho transgênica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o referido polinucleotídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ

ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17.

9. Planta de milho transgênica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o referido o promotor é um promotor de actina 1 de arroz.

5 10. Método de produzir uma planta de milho transgênica com asparagina, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) transformar uma célula de milho com um constructo de DNA heteróloga compreendendo uma molécula de promotor funcional em uma célula de milho operavelmente ligada a uma molécula de DNA codificando um polipeptídeo de asparagina sintetase;

10 b) regenerar a célula de milho em e planta de milho intata;

c) selecionar uma planta de milho que tem asparagina aumentada em um tecido relativo a um tecido de planta de milho não transformado com a referido constructo de DNA;

15 d) cultivar a planta de milho até a maturidade; e

e) colher uma semente da planta de milho,

em que a referida molécula de DNA compreende uma seqüência de ácido nucléico selecionada a partir do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácido nucléico compreendendo uma seqüência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17;

(b) uma seqüência de ácido nucléico que codifica a seqüência de polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8; e

(c) uma seqüência de ácido nucléico que hibridiza para a seqüência de (a) ou (b) ou um complemento desta sob condições de severidade alta de cerca de 0,2 x SSC e 65°C.

30 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido polipeptídeo de asparagina sintetase compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou

SEQ ID NO:8.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a referida molécula de DNA compreende a seqüência de ácido nucléico de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID
5 NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17.

13. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que também compreendendo a etapa de:

f) selecionar uma semente com proteína aumentada.

10 14. Farinha de milho com proteína aumentada relativa a outras farinhas de milho, caracterizada pelo fato de que a farinha de milho compreende um constructo de DNA heteróloga compreendendo uma molécula de promotor operavelmente ligada a uma molécula de DNA codificando um polipeptídeo de asparagina sintetase heterólogo.

15 15. Farinha de milho de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o referido polipeptídeo de asparagina sintetase de milho é um polipeptídeo de *AsnS2* de milho.

20 16. Farinha de milho de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de DNA compreende a seqüência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, ou SEQ ID NO:17.

25 17. Farinha de milho de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de DNA codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

18. Alimento, caracterizado pelo fato de que é feito a partir da farinha de milho como definida na reivindicação 13.

FIG. 1

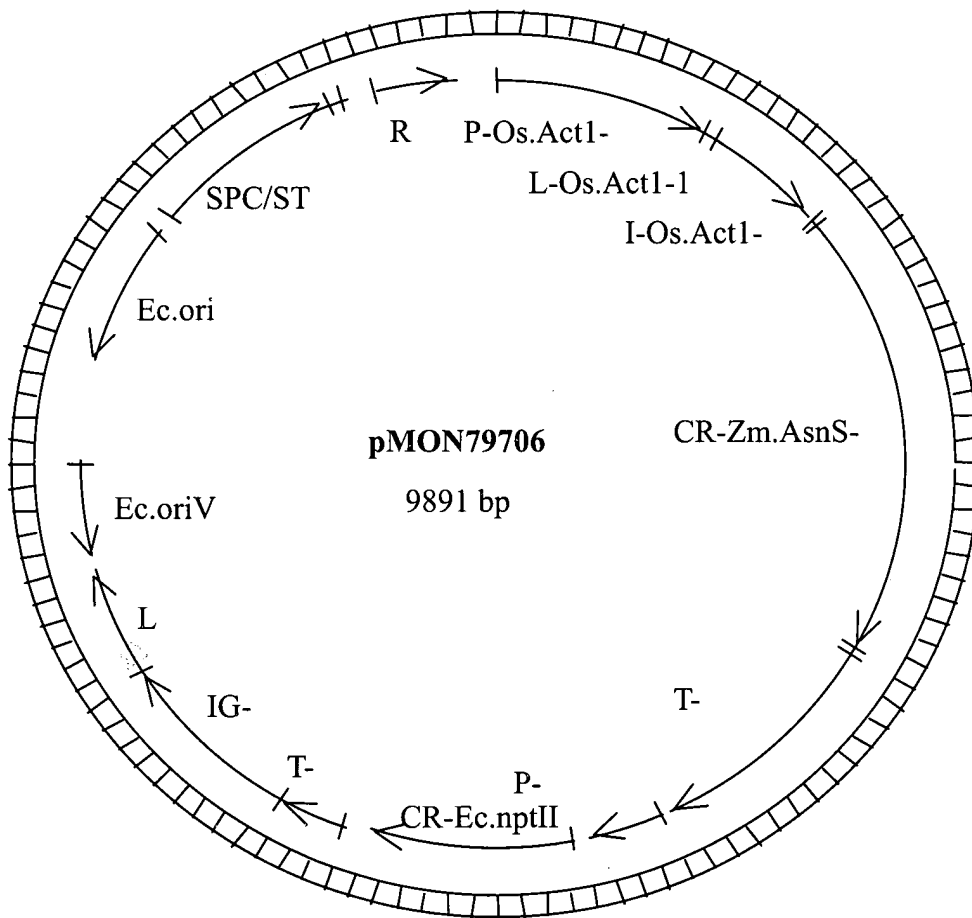


FIG. 2

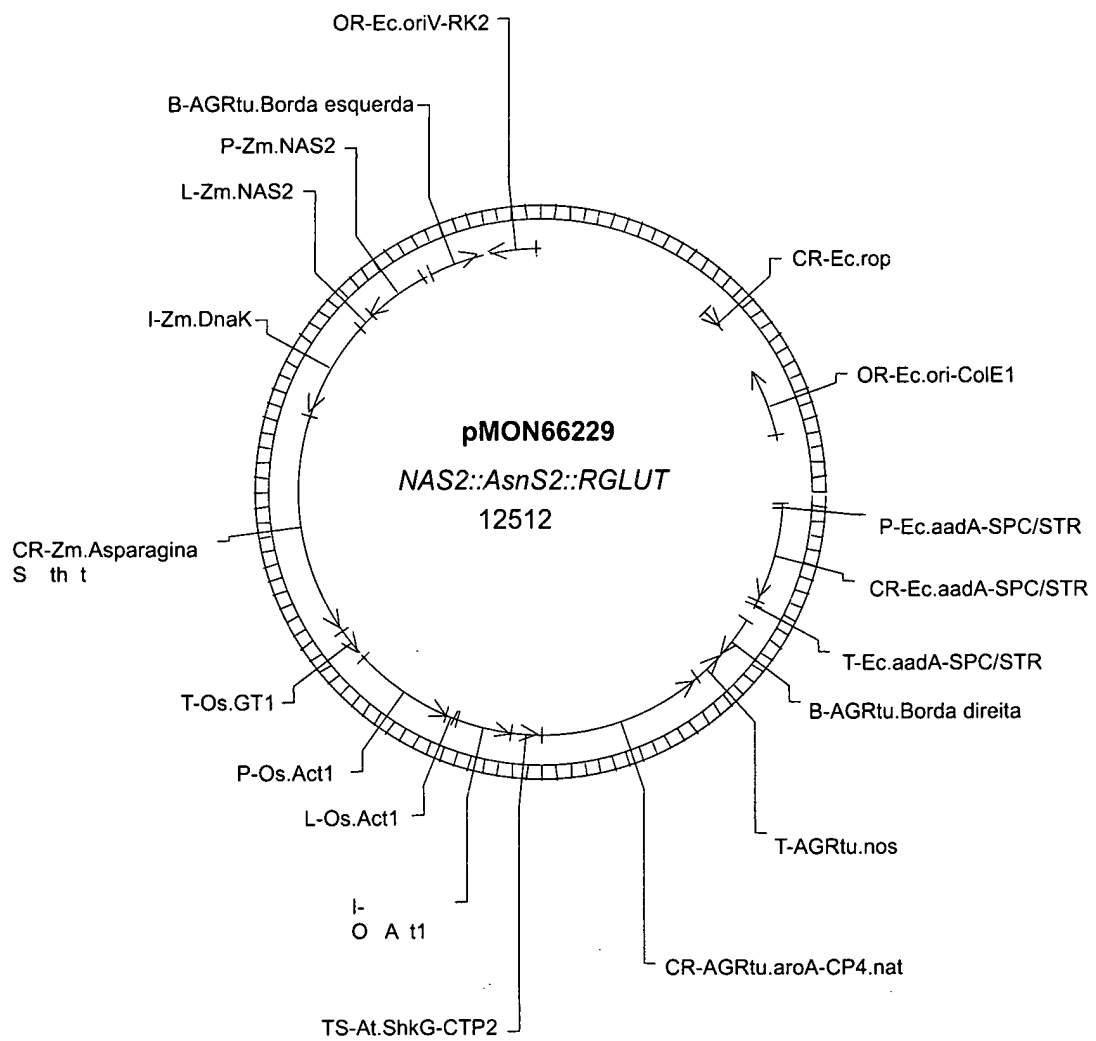


FIG. 3

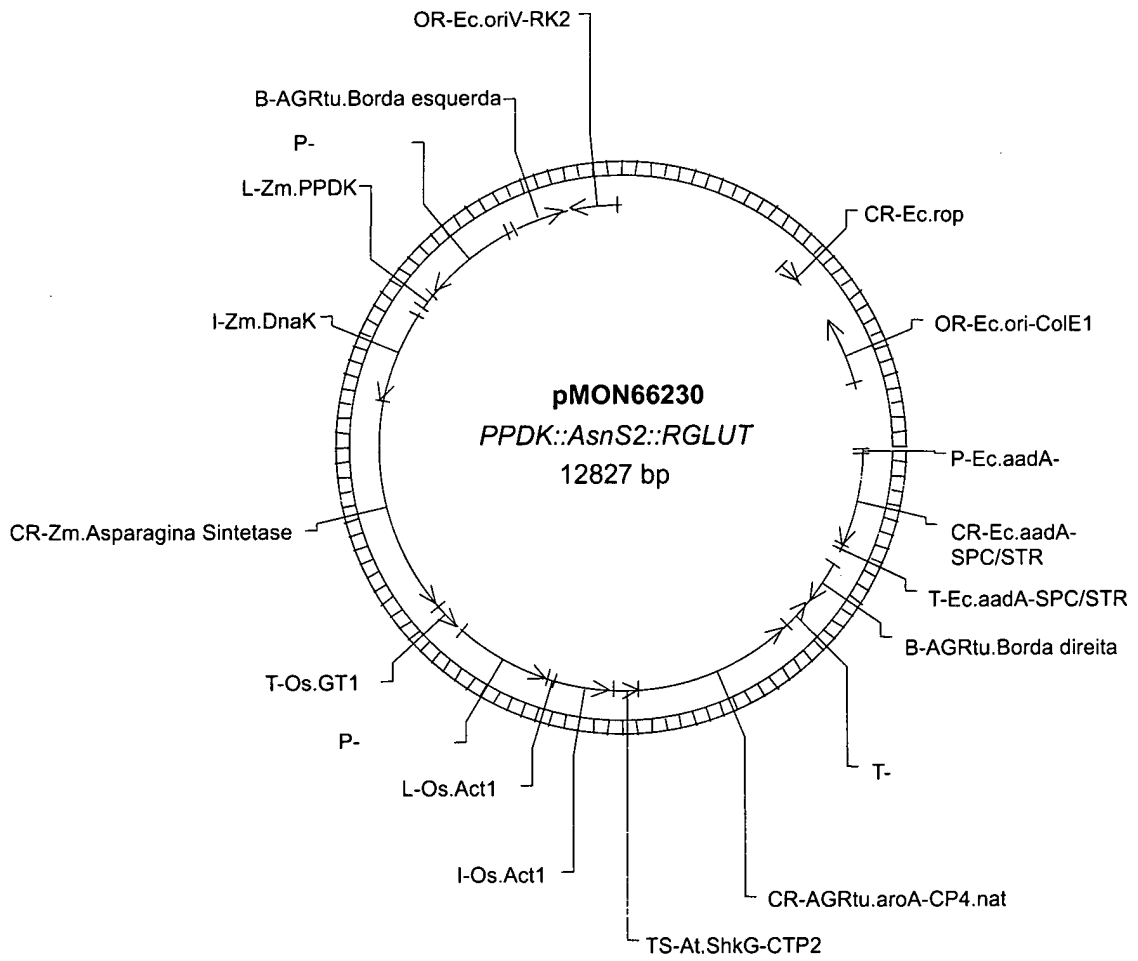


FIG. 4

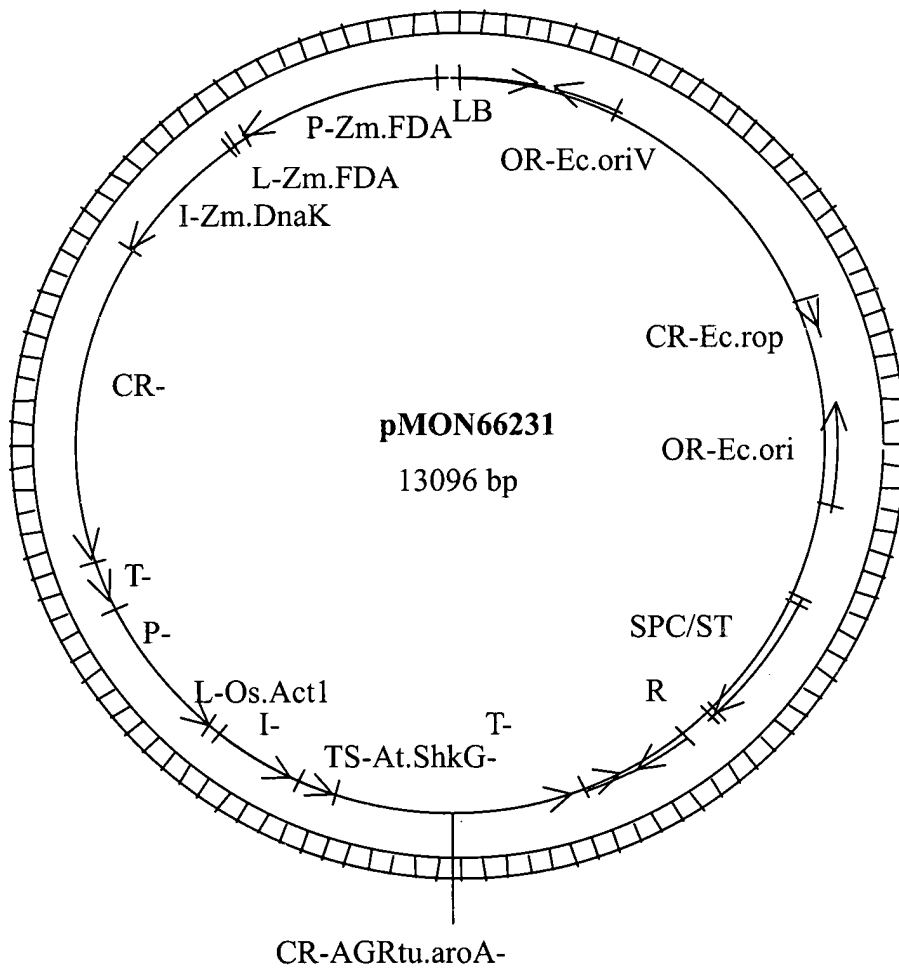


FIG. 5

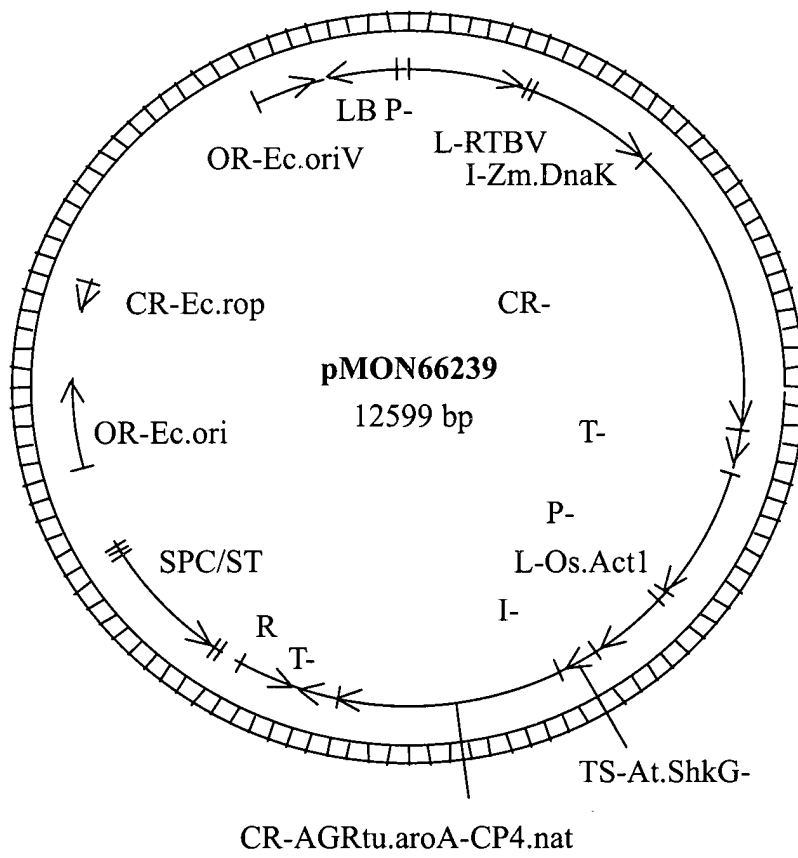


FIG. 6

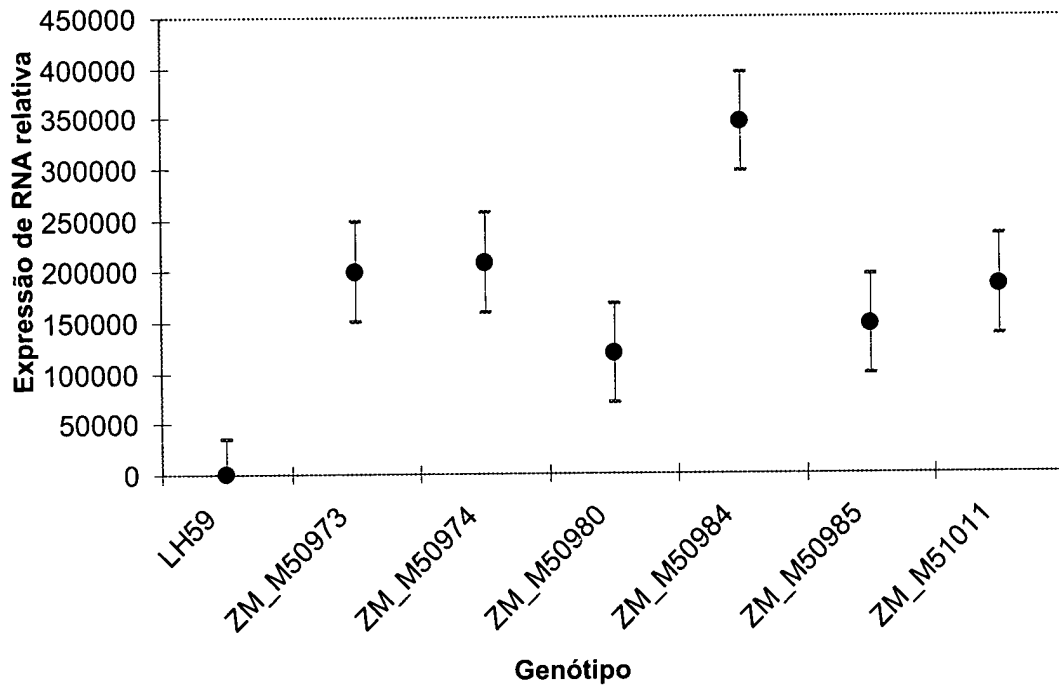
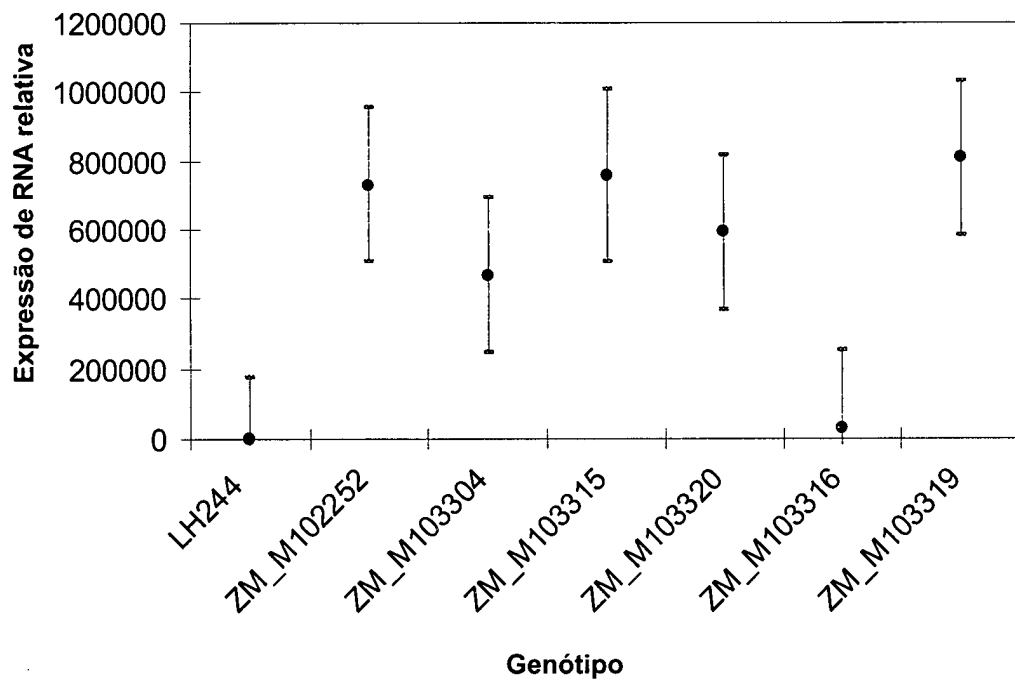


FIG. 7



RESUMO

Patente de Invenção: **"SEMENTE E PLANTA DE MILHO TRANSGÊNICAS, MÉTODO DE PRODUZIR A REFERIDA PLANTA, FARINHA DE MILHO COM PROTEÍNA AUMENTADA E ALIMENTO"**.

5 A presente invenção refere-se a uma semente e planta de milho com níveis realçados de proteína e aminoácidos. A invenção da mesma forma se refere ao constructo de DNA que fornece expressão em células de milho transgênicas de uma enzima de asparagina sintetase. Os constructos de DNA são empregados em um método para produzir sementes e plantas

10 de milho transgênicas para selecionar plantas e sementes com níveis realçados de proteína e aminoácidos.