

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

(21) **PI0617224-5 A2**

(22) Data de Depósito: 20/09/2006
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



★ B R P I O 6 1 7 2 2 4 A 2 ★

(51) Int.Cl.:

C12N 15/63 2006.01
C12N 15/82 2006.01
C12N 15/87 2006.01
C12N 15/90 2006.01
A01H 1/00 2006.01
A01H 5/00 2006.01
A01H 5/10 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA PRODUZIR SEMENTE HÍBRIDA**

(30) Prioridade Unionista: 13/10/2005 US 60/726,106,
07/08/2006 US 60/836,246, 07/08/2006 US 60/836,246, 13/10/2005
US 60/726,106

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): EDWARDS ALLEN, JAMES K. ROBERTS,
LARRY A. GILBERTSON, NANCY M. HOUMARD, SERGEY I.
IVASHUTA, SHIHSHIEH HUANG

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006036847 de 20/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/047016 de 26/04/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA PRODUZIR SEMENTE HÍBRIDA.
A presente invenção refere-se a métodos para a produção de uma
semente híbrida não natural. São também descritos miRNAs
específicos e sítios de reconhecimento de miRNA úteis para conferir
esterilidade induzida em uma plantação, e construto de DNA
recombinante incluindo tais sítios de reconhecimento de miRNA
exógeno.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA PRODUZIR SEMENTE HÍBRIDA"**.

REIVINDICAÇÕES DE PRIORIDADE E REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

5 Esse pedido reivindica o benefício de prioridade dos Pedidos de Patente Provisórios U.S. No. 60/726.106, depositado em 13 de outubro de 2005, e 60/836.246, depositado em 7 de agosto de 2006, que estão incorporados por referência na sua totalidade.

INCORPORAÇÃO DE LISTAGENS DE SEQUÊNCIA

10 As listagens de sequência contidas nos arquivos "38-21(54232)A.rpt" (tamanho de arquivo de 61 kilobytes, gravado em 12 de outubro de 2005, e depositado com o Pedido Provisório U.S. 60/726.106 em 13 de outubro de 2005), "38-21(54232)B.rpt" (tamanho de arquivo de 68 kilobytes, gravado em 7 de agosto de 2006, e depositado com o Pedido Provisório U.
15 S. 60/836.246 em 7 de agosto de 2006), e "38-21(54232)C.rpt" (tamanho de arquivo de 70 kilobytes, gravado em 19 de setembro de 2006, e depositado com o Pedido Provisório U.S. xx/xxx.xxx em 20 de setembro de 2006) estão incorporadas aqui por referência nas suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

20 A presente invenção refere-se a métodos para produzir semente híbrida, e plantas transgênicas indutivamente estéreis e constructos moleculares úteis em tais métodos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

25 Semente híbrida, isto é, semente produzida por hibridização ou fertilização cruzada de plantas intimamente relacionadas, pode ser cultivada em plantas híbridas de progênie que possuem um "vigor híbrido" ou uma combinação desejável de características não possuídas por nenhuma de suas plantas progenitoras (que são tipicamente plantas naturais). Plantas híbridas podem apresentar características de desempenho agrônômico superiores, incluindo melhoria do tamanho da planta, rendimento, composição
30 nutricional, resistência a doença, tolerância a herbicida, tolerância ao estresse (calor, frio, seca, nutriente, sal), adaptação climática, e outras caracterís

licas desejáveis.

Produção eficaz de semente híbrida requer que a polinização cruzada predomine sobre a autopolinização. Uma limitação importante na produção de semente híbrida para muitas espécies de cultivo é a falta de métodos simples, confiáveis e econômicos de gerar esterilidade em pelo menos um progenitor (especialmente no progenitor macho, para resultar em macho-esterilidade enquanto se deixa os gametas femininos intactos e acessíveis para polinização por um doador de pólen adequado). Macho esterilidade também é útil onde o espalhamento de pólen não é desejável, por exemplo, a partir de uma planta doméstica aos seus parentes selvagens, ou onde a fertilização da flor não é desejável, por exemplo, no caso de flores ornamentais que deterioram em condição após polinização.

Macho esterilidade pode ser obtida, por exemplo, por remoção física dos órgãos que contêm os gametas masculinos. Em algumas espécies, isso é um processo direto embora trabalhoso e, portanto caro (por exemplo, despendoamento em milho). Em outras espécies, tal emasculação física é difícil por causa da anatomia da planta. Técnicas alternativas que não envolvem emasculação manual ou física poderiam fornecer economias substanciais.

Gametocidas químicos também foram descritos como um método de gerar plantas macho-estéreis. Tipicamente, tal gametocida químico é um composto herbicida que quando aplicado a uma planta em um estágio do desenvolvimento apropriado ou antes da maturidade sexual é capaz de matar ou exterminar eficazmente o desenvolvimento de gametas masculinos de uma planta enquanto deixa os gametas femininos, ou pelo menos uma porção significativa deles, capazes de sofrer polinização cruzada. Por exemplo, tolerância ao glifosato foi manipulada geneticamente em milho (Patente U.S. Número 5.554.798), e uso do herbicida glifosato (*N*-fosfometilglicina) como um gametocida, e plantas transgênicas que são vegetativamente- e fêmea-tolerantes ao glifosato, mas macho-sensíveis ao glifosato, é descrito na Patente U.S. Número 4.735.649 e na Publicação de Pedido de Patente Internacional PCT WO99/46396A2. Entretanto, os níveis de glifosato necessários para matar a maioria dos gametas masculinos enquanto deixa um nú-

mero suficiente de gametas femininos ainda capazes de fertilização resultou frequentemente em atrofia ou clorose das plantas. Dessa forma, um obstáculo importante de usar glifosato como um gametocida, como é geralmente verdadeiro com a maioria dos gametocidas químicos, são os efeitos colaterais fitotóxicos que resultam da falta de seletividade suficiente para gametas.

Produção comercial de semente híbrida usando gametocidas químicos é limitada primariamente por sua falta de seletividade por gametas em geral. Compostos que possuem alguma seletividade em atingir gametas em uma quantidade maior do que tecidos vegetativos são geralmente não-discriminativos com relação ao sexo dos gametas destruídos. Dessa forma, métodos para melhorar a seletividade de um gametocida químico seriam altamente desejáveis. Ainda mais desejáveis seriam métodos que fornecem uma primeira planta parental que é macho-estéril, e uma segunda planta parental que é fêmea-estéril, garantindo assim que as sementes produzidas sejam o resultado de hibridização as duas plantas parentais, e não de autofertilização.

Essa invenção fornece métodos de produzir semente híbrida, e fornece adicionalmente constructos de DNA recombinantes, cromossomos de planta, células, plantas e sementes transgênicas, que contêm tais constructos úteis nesses métodos. Os constructos de DNA recombinantes, cromossomos de planta, células, plantas e sementes transgênicas e métodos para seu uso ao fazer semente híbrida fornecem uma forma grandemente melhorada de usar herbicidas como gametocidas químicos. Os constructos de DNA recombinantes dessa invenção incluem um sítio de reconhecimento de microRNA exógeno, que permite que a expressão de um RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida seja controlada por um microRNA endógeno para uma planta na qual o constructo de DNA recombinante é transcrito.

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codificantes de proteína, geralmente de cerca de 19 a cerca de 25 nucleotídeos (comumente cerca de 20 - 24 nucleotídeos em plantas), que guiam a clivagem *in trans* de transcritos alvo, regulando negativamente a expressão de genes envolvidos em várias vias de regulação e desenvolvimento (Bartel (2004) *Cell*, 116:281-297).

Em alguns casos, miRNAs servem para guiar processamento *in phase* de transcritos primários de siRNA (vide Allen *et al.* (2005) *Cell*, 121:207–221).

Alguns genes de microRNA (genes *MIR*) foram identificados e tornados disponíveis ao público em uma base de dados ("miRBase", disponível na rede em microrna.sanger.ac.uk/sequences). Os requerentes descreveram novos genes *MIR*, miRNAs maduros, e sítios de reconhecimento de miRNAs no Pedido de Patente U.S. 11/303.745, depositado em 15 de dezembro de 2005. Genes *MIR* adicionais e miRNAs maduros também são descritos nas Publicações de Pedido de Patente U.S. 2005/0120415 e 2005/144669A1. Genes *MIR* foram relatados ocorrer em regiões intergênicas, tanto isolados como em grupos no genoma, mas também podem estar localizados inteiramente ou parcialmente dentro de íntrons de outros genes (codificantes de proteína ou não codificantes de proteína). Para uma revisão recente de biogênese de miRNA, vide Kim (2005) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:376-385. A transcrição de genes *MIR* pode estar, pelo menos em alguns casos, sob o controle promocional de um promotor do próprio gene *MIR*. A transcrição do gene *MIR* é provavelmente geralmente mediada pela RNA polimerase II (vide, por exemplo, Aukerman & Sakai (2003) *Plant Cell*, 15:2730-2741; Parizotto *et al.* (2004) *Genes Dev.*, 18:2237-2242), e portanto poderia ser sensível a abordagens de silenciamento gênico que foram usadas em outros genes transcritos por RNA polimerase II. O transcrito primário (que pode ser policistrônico) chamado um "primRNA", uma molécula precursora de miRNA que pode ser bem grande (vários quilobases) e contém uma ou mais regiões locais de duplo filamento ou "alça" assim como o usual "cap" 5' e cauda poliadenilada de um mRNA. Vide por exemplo, Figura 1 em Kim (2005) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:376-385.

Em células de planta, acredita-se que moléculas precursoras de microRNA sejam basicamente processadas no núcleo. Em plantas, miRNAs e siRNAs são formados por enzimas do tipo DICER (DCL) distintas, e em *Arabidopsis* acredita-se que uma enzima DCL nuclear seja necessária para a formação de miRNA maduro (Xie *et al.* (2004) *PLoS Biol.*, 2:642-652). Revisões adicionais sobre a biogênese e função de microRNA são encontradas, por exemplo, em Bartel (2004) *Cell*, 116:281-297; Murchison & Hannon

(2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16:223-229; e Dugas & Bartel (2004) *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:512-520. MicroRNAs podem assim ser descritos em termos de RNA (por exemplo, sequência de RNA de um miRNA maduro ou uma molécula de RNA precursora de miRNA), ou em termos de DNA (por exemplo, sequência de DNA que corresponde a uma sequência de RNA de miRNA maduro ou uma sequência de DNA que codifica um gene *MIR* ou fragmento de um gene *MIR* ou um precursor de miRNA).

Famílias de gene *MIR* são estimadas ser responsáveis por 1% de pelo menos alguns genomas e capazes de influenciar ou regular a expressão de cerca de um terço de todos os genes (vide, por exemplo, Tomari *et al.* (2005) *Curr. Biol.*, 15:R61-64; G. Tang (2005) *Trends Biochem. Sci.*, 30:106-14; Kim (2005) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:376-385). Pelo fato dos miRNAs serem elementos regulatórios importantes em eucariotos, incluindo animais e plantas, a supressão transgênica de miRNAs poderia, por exemplo, levar ao entendimento de processos biológicos importantes ou permitir a manipulação de certas vias (por exemplo, regulação da diferenciação celular, proliferação e apoptose) úteis, por exemplo, em aplicações biotecnológicas. Vide, por exemplo, O'Donnell *et al.* (2005) *Nature*, 435:839-843; Cai *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:5570-5575; Morris & McManus (2005) *Sci. STKE*, pe41 ([stke.sciencemag.org/cgi/reprint/sigtrans; 2005/297/pe41.pdf](http://stke.sciencemag.org/cgi/reprint/sigtrans;2005/297/pe41.pdf)). Genes de microRNA (*MIR*) têm características identificadoras, incluindo conservação entre espécies de planta, uma estrutura de "foldback" estável, e processamento de uma dúplice de miRNA/miRNA* específica por enzimas do tipo Dicer (Ambros *et al.* (2003) *RNA*, 9:277-279). Essas características foram usadas para identificar miRNAs e seus genes correspondentes em plantas (Xie *et al.* (2005) *Plant Physiol.*, 138:2145-2154; Jones-Rhoades & Bartel (2004) *Mol. Cell*, 14:787-799; Reinhart *et al.* (2002) *Genes Dev.*, 16:1616-1626; Sunkar & Zhu (2004) *Plant Cell*, 16:2001-2019). Genes de microRNA disponíveis ao público estão catalogados na miRBase (Griffiths-Jones *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31:439-441).

MiRNAs são expressos em tipos celulares muito específicos em *Arabidopsis* (vide, por exemplo, Kidner & Martienssen (2004) *Nature*, 428:81-84, Millar & Gubler (2005) *Plant Cell*, 17:705-721). A supressão pode ser

limitada a um lado, borda ou outra divisão entre tipos celulares, e acredita-se que seja necessária para a padronização e especificação do tipo celular apropriado (vide, por exemplo, Palatnik *et al.* (2003) *Nature*, 425:257-263). Supressão de um gene repórter de GFP contendo um sítio de reconhecimento de miR171 endógeno foi descoberto limitar a expressão a células específicas em *Arabidopsis* transgênica (Parizotto *et al.* (2004) *Genes Dev.*, 18:2237-2242). Sítios de reconhecimento de miRNAs foram validados em todas as regiões de um mRNA, incluindo a região 5' não traduzida, região codificante, e região 3' não traduzida, indicando que a posição do sítio alvo de miRNA em relação a sequência codificante pode não necessariamente afetar a supressão (vide, por exemplo, Jones-Rhoades & Bartel (2004). *Mol. Cell*, 14:787-799, Rhoades *et al.* (2002) *Cell*, 110:513-520, Allen *et al.* (2004) *Nat. Genet.*, 36:1282-1290, Sunkar & Zhu (2004) *Plant Cell*, 16:2001-2019).

Os miRNAs maduros descritos aqui são processados a partir de genes *MIR* que geralmente pertencem a famílias canônicas conservadas entre espécies de planta distantemente relacionadas. Esses genes *MIR* e seus miRNAs maduros codificados também são úteis, por exemplo, para modificar vias de desenvolvimento, por exemplo, por afetar a diferenciação ou morfogênese celular (vide, por exemplo, Palatnik *et al.* (2003) *Nature*, 425:257-263; Mallory *et al.* (2004) *Curr. Biol.*, 14:1035-1046), para servir como fontes de sequências para miRNAs manipulados (que não ocorrem naturalmente) que são feitos para silenciar sequências diferentes dos transcritos atingidos pela sequência de miRNA de ocorrência natural (vide, por exemplo, Parizotto *et al.* (2004) *Genes Dev.*, 18:2237-2242; vide também Publicações de Pedido de Patente U.S. 2004/3411A1 e 2005/0120415), e para estabilizar dsRNA. Um gene *MIR* em si (ou suas regiões 5' ou 3' não traduzidas, ou seu promotor nativo ou outros elementos envolvidos na sua transcrição) é útil como um gene alvo para supressão gênica (por exemplo, pelos métodos da presente invenção), onde a supressão do miRNA codificado pelo gene *MIR* é desejada. Promotores de genes *MIR* podem ter padrões de expressão muito específicos (por exemplo, célula-específico, tecido-específico, ou temporalmente específico) e dessa forma são úteis em constructos recombinantes para induzir tal transcrição específica de uma se-

quência de DNA à qual eles são operativamente ligados.

Essa invenção fornece métodos para produzir semente híbrida, usando constructos de DNA recombinantes incluindo sítios de reconhecimento que correspondem a novos miRNA maduros que tem padrões de expressão específicos em plantas de cultivo. Os constructos de DNA recombinantes da invenção transcrevem RNA incluindo: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente em tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida. Esses constructos são úteis para fazer e usar cromossomos de planta, células, plantas e sementes transgênicas, incluindo plantas transgênicas indutivamente estéreis, úteis, por exemplo, na produção de semente híbrida.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção fornece um método para produzir uma semente híbrida não-natural, incluindo as etapas de: (a) fornecer uma primeira planta parental transgênica, indutivamente estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo da primeira planta parental; e (ii) um primeiro RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da primeira planta parental é induzível pela aplicação do primeiro herbicida a primeira planta parental; (b) cruzar a primeira planta parental com uma segunda planta parental sob condições onde a esterilidade tenha sido induzida na primeira planta parental, assim produzindo semente híbrida não natural.

Em outro aspecto, essa invenção fornece um método para produzir uma semente híbrida incluindo as etapas de: (a) fornecer uma primeira planta parental incluindo uma planta transgênica cultivada a partir de uma célula de planta transgênica contendo no seu genoma um primeiro constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um primeiro

miRNA maduro, e (ii) um primeiro RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, em que o primeiro miRNA maduro é expresso especificamente em tecido reprodutivo masculino da primeira planta parental, assim suprimindo especificamente a expressão da

5 proteína no tecido reprodutivo masculino, e em que a macho esterilidade da primeira planta parental é induzível pela aplicação do primeiro herbicida a primeira planta parental; (b) fornecer uma segunda planta parental que inclui uma planta transgênica cultivada a partir de uma segunda célula de planta transgênica que contém no seu genoma uma segundo constructo de DNA

10 recombinante que transcreve RNA que inclui (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um segundo miRNA maduro, e (ii) um segundo RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um segundo herbicida, em que o segundo miRNA maduro é especificamente expresso no tecido reprodutivo feminino da segunda

15 planta parental, assim suprimindo especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo feminino, e em que a fêmea esterilidade da segunda planta parental é induzível pela aplicação do segundo herbicida a segunda planta parental; (c) aplicar o primeiro herbicida e o segundo herbicida às plantas parentais, assim induzindo macho esterilidade na primeira planta

20 parental e fêmea esterilidade na segunda planta parental; (d) cruzar a primeira e segunda plantas parentais, em que óvulos da primeira planta parental são polinizados por pólen da segunda planta parental, produzindo assim semente híbrida.

Em um aspecto independente, essa invenção fornece uma planta transgênica, indutivamente estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente no tecido reprodutivo da planta; e

25 (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida; em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação do herbicida a planta.

30

Em um aspecto adicional, essa invenção fornece um constructo

de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente no tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida.

Outras modalidades específicas da invenção estão descritas na seguinte descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1A representa esquematicamente constructos de DNA recombinantes não limitantes da invenção como descrito no **Exemplo 1**. Para uso na transformação mediada por *Agrobacterium* de células de planta, pelo menos uma borda de T-DNA está geralmente incluída em cada constructo (não mostrado). Esses constructos incluem um elemento promotor ("pro"), um íntron flanqueado em um ou ambos os lados por um DNA não codificante de proteína, um elemento terminador opcional ("ter"), pelo menos um primeiro elemento de supressão de gene ("GSE" ou "GSE1") para suprimir pelo menos um primeiro gene alvo, e pode incluir opcionalmente pelo menos um segundo elemento de supressão de gene ("GSE2") para suprimir pelo menos um segundo gene alvo, pelo menos um elemento de expressão gênica ("GEE") para expressar pelo menos um gene de interesse, ou ambos. Em modalidades que contêm um elemento de expressão gênica, o elemento de expressão gênica pode estar localizado adjacente ao (ou fora do) íntron. Em uma variação dessa modalidade (não mostrada), o elemento de supressão gênica (inserido em um íntron flanqueado em um ou ambos os lados por DNA não codificante de proteína) está localizado 3' ao terminador. Em outros constructos da invenção (não mostrados), um elemento de supressão gênica (não inserido no íntron) está localizado 3' ao terminador (vide **Exemplo 22**). **Figura 1B** representa esquematicamente exemplos de constructos de DNA distintos daqueles da presente invenção. Esses constructos podem conter um elemento de supressão gênica que está localizado adjacente a um íntron ou entre dois íntrons distintos (isto quer dizer, não inseridos dentro de um único íntron), ou pode incluir um elemento de expressão gênica que inclui um elemento de supressão gênica inserido dentro de um íntron que

está flanqueado em ambos os lados por DNA codificante de proteína (por exemplo, éxons codificantes de proteína que formam um elemento de expressão gênica).

Figura 2 representa vários exemplos não limitantes de elementos de supressão gênica e DNAs exógenos capazes de serem transcritos úteis nos constructos de DNA recombinantes da invenção como descrito no **Exemplo 1**. Onde desenhado como um filamento simples (**Figuras 2A** até **2E**), estes estão convenientemente representados na direção transcricional 5' para 3' (esquerda para direita), onde as setas indicam seqüência anti-sentido (a ponta da seta apontando para a esquerda), ou seqüência sentido (ponta da seta apontando para a direita). Onde desenhado como transcritos de duplo filamento (antiparalelos) (**Figures 2F e 2G**), a direcionalidade transcricional 5' e 3' é mostrada. Linhas sólidas, linhas tracejadas, e linhas pontilhadas indicam seqüências que atingem diferentes genes alvo.

Esses elementos de supressão gênica e DNAs exógenos capazes de ser transcritos podem incluir: DNA que inclui pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do primeiro gene alvo, ou DNA que inclui múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2A**); DNA que inclui pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, ou DNA que inclui múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2B**); DNA que transcreve RNA para suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de RNA duplo filamento e inclui pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um gene alvo e pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro DNA alvo (**Figura 2C**); DNA que transcreve RNA para suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de um único RNA duplo filamento e inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido seriados que são anti-sentido a pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA sentido seriados que são pelo menos um segmento

do pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2D**); DNA que transcreve RNA para suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de múltiplos filamentos duplos de RNA e inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA sentido que são pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, e em que os ditos múltiplos segmentos de DNA anti-sentido e os múltiplos segmentos de DNA sentido são dispostos em uma série de repetições invertidas (**Figura 2E**); e DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA, ou DNA que inclui nucleotídeos de um siRNA (**Figura 2F**). **Figura 2F** representa vários arranjos não limitantes de filamento duplo RNA (dsRNA) que podem ser transcritos a partir de modalidades dos elementos de supressão gênica e DNAs exógenos capazes de ser transcritos úteis nos constructos de DNA recombinantes da invenção. Quando tal dsRNA é formado, ele pode suprimir um ou mais genes alvo, e pode formar um único filamento duplo RNA ou múltiplos filamentos duplos de RNA, ou um único "stem" ou múltiplos "stems" de dsRNA. Onde múltiplos "stems" de dsRNA são formados, eles podem ser arranjados em arranjos de "cabeça de martelo" ou "folha de trevo". DNA espaçador é opcional e pode incluir seqüência que transcreve um RNA (por exemplo, uma grande alça de seqüência anti-sentido do gene alvo ou um aptâmero) que assume uma estrutura secundária ou configuração tridimensional que confere ao transcrito uma característica desejada, tal como estabilidade aumentada, meia-vida aumentada *in vivo*, ou especificidade por célula ou tecido.

Figura 3 representa níveis de expressão dos miRNAs maduros indicados em vários tecidos de milho, como descrito em detalhe no **Exemplo 2**.

Figura 4 representa um exemplo não limitante de seqüência de DNA capaz de ser transcrita que inclui um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno, TIC809 direcionado para cloroplasto com um sítio de reconhecimento de miRNA162 (texto em negrito) localizado na região 3' não traduzida (**SEQ ID NO. 176**), como descrito em detalhe no **Exemplo 3**. A seqüência de aminoácido traduzida também é mostrada.

Figura 5 representa um exemplo não limitante de seqüência de

DNA capaz de ser transcrita que inclui um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno, TIC809 não direcionado para cloroplasto com um sítio de reconhecimento de miRNA164 (texto em negrito) localizado na região 3' não traduzida (**SEQ ID NO. 177**), como descrito em detalhes no **Exemplo 3**. A sequência de aminoácido traduzida também é mostrada.

Figura 6 representa a expressão de endosperma forte e específica do microRNA miR167g (**SEQ ID NO. 178**) clonado a partir de endosperma de milho, como descrito em detalhe no **Exemplo 4**. Northern blots de RNA de tecidos de milho (LH59) marcados com uma sonda de LNA de 22-mer de miR167 maduro com a extremidade marcada específica para **SEQ ID NO. 178 (Figura 6A)** ou com uma sonda gene de miR167g-específica de ~400bp (**Figura 6B**). O perfil de transcrição de tecidos de milho confirmou os resultados de Northern blot (**Figura 6C**); o transcrito que corresponde a miR167g foi abundantemente e especificamente expresso em tecido de endosperma (abundâncias são categorizadas como segue: >5000, alta abundância, 97º percentil; 700 – 5000, abundância moderada, 20º percentil; 400 – 700, abundância média; 200 – 400, baixa abundância; <200, não detectado). Abreviações selecionadas: "DAP" ou "DA", dias após polinização; "WK", grão inteiro, "endo", endosperma.

Figura 7 representa um mapa de anotação parcial, incluindo as localizações dos genes de miR167a e miR167g e miRNAs maduros, e elementos promotores (por exemplo, TATA boxes), do grupo genômico dentro do qual foram identificadas as seqüências promotoras de miR167g como descrito em detalhe no **Exemplo 4**. Abreviações: "PBF", fator de ligação "prolamin box"; "ARF" fator responsivo a auxina (de ligação a auxina); "NIT2", ativador de genes relacionados ao nitrogênio; "LYS14", elemento que se liga a UASLYS, um elemento ativador à montante que confere ativação e repressão aparente dependente de Lys14 e de adipato semialdeído; "GLN3", elemento que se liga ao nitrogênio à montante da seqüência de ativação de glutamina sintetase.

Figura 8 representa resultados descritos em detalhe no **Exemplo 5**. **Figura 8A** representa a estrutura de "fold-back" de **SEQ ID NO. 186**, o precursor de miRNA previsto para **SEQ ID NO. 184**; o miRNA maduro está

localizado nas bases 106 – 126, o miRNA* correspondente nas bases 156 – 175, e outro miRNA abundante foi descoberto estar localizado nas bases 100 – 120 na haste da estrutura de "fold-back". "Contagem" refere-se ao número de ocorrências de um pequeno RNA no grupo filtrado de 381.633 seqüências de miRNA putativas que foi analisado. **Figura 8B** representa um perfil de transcrição em tecidos de soja para o precursor de miRNA **SEQ ID NO. 186**. **Figura 8C** representa um perfil de transcrição em tecidos de soja para um alvo previsto, polifenol oxidase (**SEQ ID NO. 200**) para o miRNA maduro (**SEQ ID NO. 184**).

Figura 9 representa os resultados descritos em detalhe no **Exemplo 5**. **Figura 9A** representa a estrutura de "fold-back" de **SEQ ID NO. 189**, o precursor de miRNA previsto para **SEQ ID NO. 187**; o miRNA maduro está localizado nas bases 163 – 183, e o miRNA* nas bases 18 – 63. "Contagem" refere-se ao número de ocorrências de um pequeno RNA no grupo filtrado de 381.633 seqüências de miRNA putativas que foi analisado. **Figura 9B** representa um perfil de transcrição em tecidos de soja para um alvo previsto, polifenol oxidase (**SEQ ID NO. 251**) para o miRNA maduro (**SEQ ID NO. 187**).

Figura 10 representa os resultados descritos em detalhe no **Exemplo 5**. **Figura 10A** representa a estrutura de "fold-back" de **SEQ ID NO. 192**, o precursor de miRNA previsto para **SEQ ID NO. 190**; o miRNA maduro está localizado nas bases 87 – 107, e o miRNA* nas bases 150 – 169. "Contagem" refere-se ao número de ocorrências de um pequeno RNA no grupo filtrado de 381.633 seqüências de miRNA putativas que foi analisado.

Figura 11 representa os resultados descritos em detalhes no **Exemplo 5**. **Figura 11A** representa a estrutura de "fold-back" de **SEQ ID NO. 195**, o precursor de miRNA previsto para **SEQ ID NO. 193**; o miRNA maduro está localizado nas bases 61 – 81, e o miRNA* nas bases 109 – 129. "Contagem" refere-se ao número de ocorrências de pequeno RNA no grupo filtrado de 381.633 seqüência de miRNA putativas que foi analisado.

Figura 12 representa os resultados descritos em detalhe no **Exemplo 5**. **Figura 12A (superior)** representa a estrutura de "fold-back" de **SEQ ID NO. 198**, um dos precursores de miRNA previstos para **SEQ ID NO.**

196; o miRNA maduro está localizado nas bases 157 – 178, e o miRNA* nas bases 72 – 93. **Figura 12A (inferior)** representa a estrutura de "fold-back" de **SEQ ID NO. 199**, outro precursor de miRNA previsto para **SEQ ID NO. 196**; o miRNA maduro está localizado nas bases 123 – 144, e o miRNA* nas bases 58 – 79. "Contagem" refere-se ao número de ocorrências de um pequeno RNA no grupo filtrado de 381.633 seqüências de miRNA putativas que foi analisado. **Figura 12B (superior)** representa um perfil de transcrição em tecidos de soja para o miRNA precursor **SEQ ID NO. 198**. **Figura 12B (inferior)** representa um perfil de transcrição em tecidos de soja para o miRNA precursor **SEQ ID NO. 199**.

Figuras 13 e 14 representam os perfis de transcrição de conjuntos de sondas de seqüências que foram identificadas como incluindo genes de miRNA (dados na **Tabela 6**) especialmente úteis em métodos dessa invenção e que têm os padrões de expressão desejados, isto é, em tecido reprodutivo feminino (**Figura 13**) ou em tecido reprodutivo masculino (**Figura 14**), conforme descrito em detalhe no **Exemplo 6**.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos usados têm o mesmo significado que o comumente compreendido por um versado na técnica a qual essa invenção pertence. Geralmente, a nomenclatura usada e os procedimentos de fabricação ou laboratoriais descritos abaixo são bem-conhecidos e comumente empregados na técnica. Métodos convencionais são usados para esses procedimentos, tais como aqueles fornecidos na técnica e várias referências gerais. A menos que estabelecido de outra maneira, seqüências de ácido nucléico no texto desse pedido são dadas, quando lidas da esquerda para a direita, na direção 5' ou 3'. Onde um termo é fornecido no singular, os inventores também contemplam aspectos da invenção descritos pelo plural daquele termo. Onde há discrepâncias em termos e definições usadas nas referências que são incorporadas por referência, os termos usados nesse pedido devem ter as definições dadas. Outros termos técnicos usados têm seu significado comum na técnica em que eles são usados, como exemplificado por uma variedade de dicionários técnicos. Os inventores não pretendem ser limitados a um meca-

nismo ou modo de ação. Referência a isso é fornecida apenas para fins ilustrativos.

MÉTODO PARA PRODUZIR SEMELHANTE HÍBRIDA NÃO-NATURAL

Um primeiro aspecto dessa invenção fornece um método para
5 produzir uma semente híbrida não natural, incluindo as etapas de: (a) fornecer uma primeira planta parental transgênica, indutivamente estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso
10 em tecido reprodutivo da primeira planta parental; e (ii) um primeiro RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da primeira planta parental é induzível pela aplicação do primeiro herbicida a primeira planta
15 parental; (b) cruzar a primeira planta parental com uma segunda planta parental sob condições onde a esterilidade tenha sido induzida na primeira planta parental, assim produzindo semente híbrida não natural.

Plantas: o método dessa invenção inclui fornecer uma planta transgênica, indutivamente estéril, útil como uma planta parental, que é preferivelmente uma planta de cultivo propagada por semente, tal como aquelas
20 descritas sob o título "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas". Exemplos não limitantes de plantas preferidas incluem milho, arroz, trigo, aveia, cevada, centeio, triticale, painço, sorgo, quinoa, amaranto, trigo sarraceno, grama de forragem, turfa, alfafa, algodão, açafrão,
25 a, girassol, soja, canola, colza, linho, amendoim, feijão, ervilha, lentilha, alfafa, alface, aspargo, alcachofra, aipo, cenoura, rabanete, repolho, couve galega, mostarda, brócolis, couve flor, couve de Bruxelas, nabo, couve rábano, pepino, melões, abóbora moranga, abóbora menina, cebola, alho-poró, chalotas, cebolinha, tomate, berinjela, pimenta, fisális, beterraba, acelga, espinafre,
30 fre, plantas ornamentais, e árvores florestais. Plantas particularmente preferidas incluem milho, arroz, trigo, algodão, açafrão, girassol, canola, e colza. Em uma modalidade particularmente preferida, o método é útil para produzir a semente de milho híbrida não natural.

Esterilidade: por "esterilidade" entende-se a incapacidade de produzir com sucesso semente de progênie viável. Macho esterilidade inclui, por exemplo, a incapacidade de produzir gametas masculinos (por exemplo, grãos de pólen férteis, maduros) capazes de fertilizar gametas femininos, ou a incapacidade de produzir as estruturas reprodutivas masculinas, (por exemplo, anteras, estames, filamentos) necessários para gametas masculinos serem capazes de fertilização normal de gametas femininos. Fêmea esterilidade inclui, por exemplo, a incapacidade de produzir gametas femininos capazes de ser fertilizados, ou a incapacidade de produzir uma semente completamente desenvolvida (seja viável ou estéril), ou a incapacidade de produzir semente de progênie viável capaz de ser germinada e se desenvolver em uma planta de progênie normal.

Tecido reprodutivo: em modalidades da planta transgênica indutivamente estéril, onde a esterilidade é macho esterilidade, o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino. Tecido reprodutivo masculino inclui qualquer tecido que é necessário para o desenvolvimento de gametas masculinos para fertilidade (isto é, que tem a capacidade de fertilizar um gameta feminino), por exemplo, pólen ou gametas masculinos em qualquer estágio do desenvolvimento, anteras, estames, filete, pendões, e outras partes florais masculinas, tecidos nutritivos, e outras estruturas envolvidas na capacidade de uma planta parental masculina fertilizar uma planta parental feminina.

Em modalidades da planta transgênica indutivamente estéril onde a esterilidade é fêmea esterilidade, o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino. Tecido reprodutivo feminino inclui qualquer tecido que é necessário para o desenvolvimento de gametas femininos para fertilidade (isto é, que têm a capacidade de ser fertilizados por um gameta masculino, mais preferivelmente que têm a capacidade de produzir uma semente completamente desenvolvida (seja viável ou estéril), e em muitas modalidades o mais preferivelmente tendo a habilidade de produzir semente de progênie viável capaz de ser germinada e desenvolvida em uma planta de progênie normal). Tecido reprodutivo feminino inclui, por exemplo óvulos ou gametas femininos em qualquer estágio de desenvolvimento, estigmas, pistilos, e outras partes

florais femininas, revestimentos de semente, frutos, raques, espigas, ou outros tecidos nutritivos, de suporte ou protetores, e qualquer outra estrutura envolvida na capacidade de uma planta parental feminina ser fertilizada por uma planta parental masculina, produzir uma semente completamente desenvolvida, ou produzir uma semente de progênie viável. Em certas modalidades, esterilidade resulta em falha de um óvulo fertilizado se desenvolver para uma semente viável, e "tecido reprodutivo" refere-se a um óvulo fertilizado (por exemplo, um zigoto ou um embrião de qualquer estágio de desenvolvimento, ou os tecidos maternos necessários para o desenvolvimento de um óvulo fertilizado em uma semente tal como um endosperma ou outros tecidos nutritivos).

miRNA maduro: por "miRNA maduro" entende-se o pequeno RNA ("microRNA") processado a partir de um precursor de miRNA (por exemplo, primRNA ou pré-miRNA), que é capaz de reconhecer e se ligar a uma sequência específica ("sítio de reconhecimento de miRNA") dentro de um transcrito de RNA, e guiar a clivagem daquele transcrito. miRNAs maduros preferidos incluem miRNAs maduros que são expressos especificamente no tecido reprodutivo de uma planta. Em uma modalidade não limitante da invenção, o miRNA maduro é um miRNA de uma planta de cultivo, tal como miRNA de milho ou um miRNA de soja. Exemplos não limitantes de miRNAs úteis nessa invenção são fornecidos nos Exemplos de trabalho e incluem, mas não são limitados, aos miRNAs identificados nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6, incluindo os miRNAs que têm **SEQ ID NO. 297, SEQ ID NO. 302, SEQ ID NO. 314, SEQ ID NO. 319, SEQ ID NO. 323, SEQ ID NO. 328, SEQ ID NO. 333, ou SEQ ID NO. 338.**

Sítios de reconhecimento de miRNA: o constructo de DNA recombinante transcreve RNA que inclui um ou mais sítios de reconhecimento de miRNA exógenos, que podem ser uma ou mais cópias do mesmo sítio de reconhecimento de miRNA exógeno ou uma ou mais cópias de diferentes sítios de reconhecimento de miRNA exógeno. O sítio de reconhecimento de miRNA exógeno pode estar localizado em qualquer local no RNA transcrito onde, quando o miRNA maduro não está presente, a transcrição produz um RNA mensageiro que é traduzível para a proteína de tolerância a herbicida

desejada, e onde o miRNA maduro está presente, o miRNA maduro se liga ao transcrito de RNA e suprime a expressão do RNA mensageiro. Um ou mais sítios de reconhecimento de miRNA exógenos podem estar localizados em regiões codificantes ou em regiões não codificantes do RNA mensageiro.

5 Em várias modalidades, o sítio de reconhecimento de miRNA exógeno está localizado dentro de pelo menos um de (a) uma região a 5' da sequência codificante do RNA mensageiro; (b) uma região a 3' da sequência codificante do RNA mensageiro; e (c) o RNA mensageiro. Em uma modalidade preferida, o pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA está localizado na

10 região 3' não traduzida do RNA mensageiro. Em várias modalidades, o constructo de DNA recombinante ainda inclui pelo menos um elemento selecionado a partir de: (a) um promotor de planta; (b) um elemento de supressão gênica; (c) um íntron; (d) um elemento de expressão gênica; (e) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante; (f) DNA que

15 transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante e DNA que transcreve RNA regulatório capaz de regular a expressão de uma sequência alvo, caracterizado em que a regulação é dependente da conformação do RNA regulatório, e a conformação do RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do aptâmero de RNA, e (g) pelo menos uma

20 borda de T-DNA. Esses elementos adicionais são descritos em detalhe abaixo sob o título "Plantas Transgênicas Indutivamente Estéreis que Contêm um Constructo de DNA Recombinante".

Qualquer sítio de reconhecimento de miRNA que é reconhecido por um miRNA maduro que tem o padrão de expressão desejado (isto é,

25 expressão específica em tecido reprodutivo masculino ou feminino) é útil em modalidades dessa invenção. Múltiplos sítios de reconhecimento de miRNA podem ser usados para suprimir especificamente a expressão da proteína em uma combinação desejada de tecidos reprodutivos. Por exemplo, um constructo de DNA recombinante pode incluir múltiplos sítios de reconheci-

30 mento, em que cada um dos quais é reconhecido por um miRNA que tem expressão específica em um tecido reprodutivo masculino (ou feminino) diferente (por exemplo, um miRNA expresso em pólen e um miRNA expresso no pendão). A seleção de um miRNA maduro apropriado ou seu sítio de reco-

nhecimento de miRNA correspondente é realizada por métodos conhecidos dos versados na técnica, incluindo aqueles ilustrados em detalhe nos exemplos de trabalho fornecidos aqui. Métodos incluem clonagem de moléculas de miRNA maduro ou precursoras de miRNA (pré-miRNAs, primRNAs) de plantas inteiras ou sementes ou de tecidos selecionados, informação de miRNA baseada em bioinformática, Southern blots de miRNA ou moléculas precursoras de miRNA, determinar os padrões de expressão de promotor de miRNA, etc. Em modalidades não limitantes, o sítio de reconhecimento de miRNA é reconhecido por um miRNA maduro derivado da estrutura de "fold-back" de uma sequência de MIR identificada nas **Tabelas 1** até **6**; particularmente preferidos são os sítios de reconhecimento de miRNA reconhecidos pelos miRNAs maduros identificados na **Tabela 6**.

Clivagem de um transcrito de RNA alvo e a subsequente supressão do RNA alvo é dependente de pareamento de base entre o miRNA maduro e seu sítio de reconhecimento de miRNA cognato. Dessa forma, o pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno é desenhado para ter complementaridade de sequência suficiente ao miRNA maduro para permitir o reconhecimento e ligação pelo miRNA maduro. Em plantas, complementaridade de sequência de um miRNA e seu sítio de reconhecimento é tipicamente alta, por exemplo, complementaridade perfeita entre 19, 20 ou 21 de 22 nucleotídeos (no caso de um miRNA maduro que tem 21 nucleotídeos de extensão), isto é, complementaridade de cerca de 90% ou mais. Um grau similar de complementaridade é preferível para sítios de reconhecimento para miRNAs de planta de qualquer extensão (por exemplo, 20, 21, 22, 23, e 24 nucleotídeos). Os requisitos de sequência para ligação de miRNA maduro a um sítio de reconhecimento, e métodos para prever ligação de miRNA a uma dada sequência, são discutidos, por exemplo, em Llave *et al.* (2002) *Science*, 297:2053-2056, Rhoades *et al.* (2002) *Cell*, 110:513-520, Jones-Rhoades and Bartel (2004) *Mol. Cell*, 14:787-799, Schwab *et al.* (2005) *Developmental Cell*, 8:517-527, e Xie *et al.* (2005) *Plant Physiol.*, 138:2145-2154. Quando se desenha um sítio de reconhecimento de miRNA assim como sua localização exata em, ou adjacente a, um RNA mensageiro, também é preferível evitar seqüências que têm características indesejáveis, tais se-

qüências codificando polipeptídeos indesejáveis, conforme descrito abaixo sob o título "Genes Alvo". Ao desenhar RNA mensageiro como um transgene a ser expresso, a introdução não intencional de um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno é evitada onde supressão por um miRNA maduro não é desejada.

Expressão específica: por "especificamente expresso em tecido reprodutivo" entende-se que o miRNA maduro é transcrito em tecido reprodutivo em um nível suficiente para permitir que o miRNA suprima especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, isto é, suprima especificamente a expressão no tecido reprodutivo da proteína que confere tolerância a um herbicida, mas não suprima substancialmente a expressão da mesma proteína em tecidos diferentes dos tecidos reprodutivos. Supressão substancial de expressão inclui pelo menos 30, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 85, pelo menos 90, pelo menos 95, ou pelo menos 98 por cento de supressão de expressão, em relação aquela em células de controle (isto é, células que incluem um constructo de DNA recombinante análogo, por exemplo, um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui o mesmo RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida, mas que não inclui um sítio de reconhecimento de RNA exógeno reconhecível pelo miRNA maduro especificamente expresso no tecido reprodutivo da planta). Em modalidades preferidas, o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo para um grau suficiente para resultar em esterilidade do tecido reprodutivo quando o herbicida é aplicado. Aqueles versados na técnica reconhecem que, em certos casos, tolerância a um herbicida pode ser adequadamente obtida em níveis de expressão moderados ou mesmo baixos de uma proteína de tolerância a herbicida. Portanto, não é uma exigência que o miRNA maduro esteja completamente ausente em tecidos diferentes do tecido reprodutivo, nem é uma exigência que a expressão da proteína de tolerância ao herbicida esteja completamente suprimida no tecido reprodutivo.

Proteína que confere tolerância a herbicida: qualquer proteína que confere tolerância para uma planta a um herbicida pode ser usada. Em

muitas modalidades, o herbicida é um herbicida sistêmico. Exemplos não limitantes de herbicidas úteis em aspectos dessa invenção incluem os herbicidas glifosato, dicamba, glufosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinil, dalapon, dicamba, cicloezanodiona, inibidores de protoporfirinogênio oxidase, e isoxaflutol. Exemplos não limitantes de proteínas que conferem tolerância ao glifosato incluem 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase ("EPSPS" ou "aroA", vide Patentes U. S. números 5.627.061, 5.633.435, 6.040.497, e 5.094.945), glifosato oxidorreductase ("GOX", vide Patente U.S. Número 5.463.175), glifosato descarboxilase (vide Publicação de Pedido de Patente U. S. 2004/0177399), glifosato *N*-acetil transferase ("GAT", vide Publicação de Pedido de Patente U. S. 2003/0083480) ou qualquer outro gene que forneça resistência ao glifosato. Uma modalidade particularmente preferida é "epsps-cp4" ou 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*; Patente U.S. número 5.633.435 descreve seqüências de ácido nucléico e seqüências de aminoácido de epsps-cp4, vetores de transformação que contêm esse gene, e métodos de fazer plantas resistentes ao glifosato. Exemplos não limitantes de proteínas que conferem tolerância a outros herbicidas incluem dicamba monooxygenase, que confere tolerância a herbicidas semelhantes a auxina tal como dicamba (vide Publicações de Pedido de Patente U. S. 2003/0115626, 2003/0135879); fosfinotricina acetiltransferase ("pat" ou "bar"), que confere tolerância a fosfinotricina ou glufosinato (vide Patente U. S. Números 5.646.024, 5.561.236, 5.276.268 5.637.489, e US 5.273.894; vide também Pedido de Patente Europeu EP 275.957;); ácido 2,2-dicloropropiônico desalogenase, que confere tolerância ao ácido 2,2-dicloropropiônico ("Dalapon") (vide Publicação de Patente PCT WO99/27116); acetoidroxiácido sintase ou acetolactato sintase, que confere tolerância a inibidores de acetolactato sintase tais como sulfoniluréia, imidazolinona, triazolopirimidina, pirimidiloxibenzoatos, e ftalídeo (vide Patentes U. S. números 6.225.105, 5.767.366, 4.761.373, 5.633.437, 6.613.963, 5.013.659, 5.141.870, 5.378.824 e 5.605.011); haloarilnitrilase ("Bxn"), que confere tolerância ao bromoxinil (vide Patente U. S. número 4.810.648; vide também Publicações de Pedido de Patente PCT WO89/00193 e WO87/04181A1); acetil-coenzima A carboxilase modificada,

que confere tolerância a cicloexanodiona ("setoxidim") e ariloxifenoxipropionato ("haloxifop") (vide Patente U. S. número 6.414.222); diidropteroato sintase ("sul I"), que confere tolerância a herbicidas de sulfonamida (vide Patente U.S. Números 5.597.717, 5.633.444, e 5.719.046); polipeptídeo de fotosistema II de 32 kDa ("psbA"), que confere tolerância a herbicidas de triazina (vide Hirschberg *et al.* (1983) *Science*, 222:1346-1349); antranilato sintase, que confere tolerância a 5-metiltryptofano (vide Patente U. S. número 4.581.847); ácido dihidrodipicolínico sintase ("dap A"), que confere tolerância a aminoetil cisteína (vide Publicação de Pedido de Patente PCT WO89/11789); fitoeno desaturase ("crtf"), que confere tolerância a herbicidas de piridazinona tais como norflurazon (vide Publicação de Patente Japonesa JP06343473); hidroxifenil piruvato dioxigenase, que confere tolerância a herbicidas de ciclopropilisoxazol tal como isoxaflutol (vide Patente U. S. número 6.268.549; vide também Publicação de Pedido de Patente PCT WO96/38567); protoporfirinogênio oxidase I modificada ("protox"), que confere tolerância a inibidores de protoporfirinogênio oxidase (vide Patente U. S. número 5.939.602); ariloxialcanoato dioxigenase ("AAD-1"), que confere tolerância a um herbicida que contém uma porção de ariloxialcanoato (vide Publicação de Pedido de Patente PCT WO05/107437), exemplos de tais herbicidas incluem fenóxi auxinas (tais como 2,4-D e diclorprop), piridilóxi auxinas (tais como fluroxipir e triclopir), inibidores de ariloxifenoxipropionatos (AOPP) acetilcoenzima A carboxilase (ACCase), (tais como haloxifop, quizalofop, e diclofop) e inibidores de fenoxiacetato protoporfirinogênio oxidase IX 5-modificados (tais como piraflufen e flumiclorac).

Combinações de plantas parentais: o método dessa invenção pode ser executado usando várias combinações das primeiras plantas parentais e segundas plantas parentais. Em muitas modalidades do método, a segunda planta parental é tolerante ao primeiro herbicida; por exemplo, a segunda planta parental pode conter no seu genoma um transgene que confere tolerância ao primeiro herbicida. Essa invenção abrange modalidades do método em que: (a) o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a primeira planta parental é indutivamente macho estéril, e a segunda planta parental é normalmente fértil; ou (b) o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo

masculino, a primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a segunda planta parental é fêmea-estéril; ou (c) o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a segunda planta parental é indutivamente fêmea-estéril; ou (d) o
5 tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a primeira planta parental é indutivamente fêmea-estéril, e a segunda planta parental é normalmente fértil; ou (e) o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a primeira planta parental é indutivamente fêmea-estéril, e a segunda planta parental é macho-estéril; ou (f) o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a primeira
10 planta parental é indutivamente fêmea-estéril, e a segunda planta parental é indutivamente macho-estéril.

Em uma modalidade do método, o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a segunda planta parental inclui uma segunda planta parental
15 transgênica, indutivamente fêmea-estéril contendo no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um segundo miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo feminino da segunda planta parental; e (ii) um segundo RNA mensageiro
20 que codifica uma segunda proteína que confere tolerância a um segundo herbicida; em que o segundo miRNA maduro suprime especificamente a expressão da segunda proteína no tecido reprodutivo feminino, e em que a fêmea esterilidade da segunda planta parental é induzível pela aplicação do segundo herbicida a segunda planta parental. Em outra modalidade, o tecido
25 reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a primeira planta parental é indutivamente fêmea estéril, e a segunda planta parental inclui uma segunda planta parental transgênica, indutivamente macho estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui:
30 (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um segundo miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo masculino da segunda planta parental; e (ii) um segundo RNA mensageiro que codifica uma segunda proteína que confere tolerância a um segundo herbicida, em que o segundo miRNA maduro suprime especifica-

mente a expressão da segunda proteína no tecido reprodutivo masculino, e em que a macho esterilidade da segunda planta parental é induzível pela aplicação do segundo herbicida a segunda planta parental. Nessas modalidades, o primeiro e segundo RNAs mensageiros podem ser idênticos, ou
5 podem ser diferentes. Nessas modalidades, o primeiro herbicida e o segundo herbicida podem ser idênticos ou podem ser diferentes. Em alguns casos, pelo menos um do primeiro herbicida e do segundo herbicida inclui um herbicida sistêmico. Em modalidades preferidas, pelo menos um do primeiro herbicida e do segundo herbicida inclui pelo menos um herbicida seleciona-
10 do a partir do grupo que consiste em glifosato, dicamba, glufosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinil, ácido 2,2-dicloropropiônico, inibidores de acetolactato sintase, cicloezanodiona, ariloxifenoxipropionato, herbicidas de sulfonamida, herbicidas de triazina, 5-metiltryptofano, aminoetil cisteína, herbicidas de piridazinona, herbicidas de ciclopropilisoxazol, inibidores de protoporfirinogênio oxidase, e herbicidas que contêm uma porção de ariloxialcanoato.

Em uma modalidade do método, a primeira planta parental é uma planta transgênica indutivamente estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo
20 menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo masculino da planta; e (ii) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo masculino, e em que a
25 macho esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação do herbicida à planta, e a segunda planta parental é normalmente fértil. Para induzir macho esterilidade da primeira planta parental, o herbicida é preferivelmente aplicado sob um regime que resulta na incapacidade da primeira planta parental produzir gametas masculinos (ou as estruturas reprodutivas masculinas) necessárias para fertilização normal da segunda planta parental. Em
30 tais modalidades, a segunda planta parental é geralmente tolerante ao mesmo herbicida usado para induzir macho esterilidade da primeira planta parental, e assim a primeira e segunda plantas parentais podem ser tratadas

com o mesmo herbicida, preferivelmente simultaneamente (por exemplo, juntas em um campo). Um cruzamento da primeira e segunda plantas parentais produz semente que é o resultado de polinização da primeira planta parental pela segunda planta parental.

5 Em outra modalidade do método, a primeira planta parental é uma planta transgênica indutivamente estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro; e (ii) um RNA mensageiro que codifica uma proteína que
10 confere tolerância a um herbicida, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo feminino ou no óvulo fertilizado, e em que a fêmea esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação do herbicida à planta, o herbicida é preferivelmente aplicado sob um regime que resulta, por exemplo, na incapacidade da primeira planta
15 parental produzir gametas femininos capazes de ser fertilizados, ou na incapacidade de produzir uma semente completamente desenvolvida (seja viável ou estéril), ou a incapacidade de produzir semente de progênie viável capaz de ser germinada e se desenvolver em uma planta de progênie normal. Em tais modalidades, a segunda planta parental é geralmente tolerante ao
20 mesmo herbicida usado para induzir fêmea esterilidade da primeira planta parental, e assim a primeira e segunda plantas parentais podem ser tratadas com o mesmo herbicida, preferivelmente simultaneamente. Um cruzamento da primeira e segunda plantas parentais produz semente que é o resultado de polinização da segunda planta parental pela primeira planta parental.

25 Outro aspecto da invenção fornece um método para produzir uma semente híbrida não natural, que inclui as etapas de: (a) fornecer uma primeira planta parental que inclui uma planta transgênica cultivada a partir de uma primeira célula de planta transgênica (por exemplo, uma primeira célula de milho transgênica) que contém no seu genoma um primeiro constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo menos
30 um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um primeiro miRNA maduro, e (ii) um primeiro RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, em que o primeiro

miRNA maduro é especificamente expresso em tecido reprodutivo masculino da primeira planta parental, assim suprimindo especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo masculino, e em que a macho esterilidade da primeira planta parental é induzível pela aplicação do primeiro herbicida a primeira planta parental; (b) fornecer uma segunda planta parental que inclui uma planta transgênica cultivada a partir de uma segunda célula de planta transgênica (por exemplo, uma segunda célula de milho transgênica) que contém no seu genoma um segundo constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um segundo miRNA maduro, e (ii) um primeiro RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um segundo herbicida, em que o segundo miRNA maduro é especificamente expresso em tecido reprodutivo feminino da segunda planta parental, assim suprimindo especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo feminino, e em que a fêmea esterilidade da segunda planta parental é induzível pela aplicação do segundo herbicida a segunda planta parental; (c) aplicar o primeiro herbicida e o segundo herbicida às plantas parentais, assim induzindo macho esterilidade na primeira planta parental e fêmea esterilidade na segunda planta parental; (d) cruzar a primeira e segunda plantas parentais, em que óvulos da primeira planta parental são polinizados por pólen da segunda planta parental, assim produzindo semente híbrida não natural (por exemplo, semente de milho híbrida não natural).

Ao praticar qualquer um dos métodos para produzir semente híbrida, "cultivado" refere-se a cultivar uma planta transgênica por regeneração direta a partir da primeira célula de planta transgênica ou cultivar uma planta de progênie transgênica da planta transgênica regenerada. Métodos para regenerar diretamente uma planta transgênica a partir de uma célula de planta transgênica, ou para cultivar plantas de progênie transgênicas (incluindo plantas de progênie natural e plantas de progênie híbrida) são bem-conhecidas na técnica, e são descritas aqui sob o título "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas".

O segundo RNA mensageiro pode ser o mesmo ou pode ser diferente do primeiro RNA mensageiro. Em várias modalidades, o primeiro

RNA mensageiro e o segundo RNA mensageiro (a) são idênticos; ou (b) são diferentes e codificam segmentos diferentes da proteína; (c) são diferentes e codificam segmentos de proteínas diferentes. Em modalidades preferidas, o primeiro e segundo RNA mensageiros (sejam os mesmos ou diferentes) conferem tolerância ao mesmo herbicida, o que fornece a conveniência de tratar um campo da primeira e segunda plantas parentais misturadas com um único herbicida; quando necessário, o herbicida é aplicado em um ou mais momentos a fim de induzir macho esterilidade da primeira planta parental e fêmea esterilidade da segunda planta parental. Em alguns casos, o primeiro RNA mensageiro codifica uma primeira proteína que confere tolerância a um herbicida, e o segundo RNA mensageiro codifica uma segunda proteína diferente, que confere tolerância ao mesmo herbicida; um exemplo não limitante é onde a primeira e segunda proteínas são selecionadas a partir de um grupo (incluindo 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, glifosato acetiltransferase e glifosato descarboxilase) em que todos conferem tolerância ao glifosato. Em outras modalidades, o primeiro e o segundo RNA mensageiros conferem tolerância a dois herbicidas diferentes, e preferivelmente a primeira e a segunda plantas parentais contêm ambas no seu genoma DNA que codifica duas proteínas, cada uma conferindo tolerância a um dos dois herbicidas, permitindo que um campo da primeira e segunda plantas parentais seja tratado com os dois herbicidas (simultaneamente ou separadamente). Em várias modalidades do método o primeiro herbicida e o segundo herbicida (a) são idênticos; (b) são diferentes (em que a primeira e a segunda plantas parentais preferivelmente têm tolerância tanto ao primeiro como ao segundo herbicida).

Regimes de aplicação de herbicida são usados por meio dos quais esterilidade induzível é obtida preferivelmente sem perda de campo ou outros resultados indesejáveis. Aplicação(ões) de herbicida (é)são reguladas a fim de induzir esterilidade. Em um exemplo análogo, uma linhagem de algodão transgênico (RR1445) que contém EPSPS sob o controle de um promotor constitutivo de FMV 35S, foi descoberto ter alta expressão de EPSPS na maioria dos tecidos vegetativos, mas baixa expressão de EPSPS em certos tipos de tecido reprodutivos masculinos (células mãe de pólen, gametófi-

tos masculinos, e tapetum); aplicações de glifosato após o estágio de quatro folhas resulta em esterilidade masculina (vide, Chen *et al.* (2006) *Plant Biotechnol. J.*, 4:477-487, publicado antecipadamente online em 7 de junho de 2006, doi: 10.1111/j.1467-7652.2006.00203.x).

5 Em modalidades preferidas, o método é útil para produzir semente híbrida não natural de uma planta de cultivo propagada por semente, tal como aquelas descritas sob o título "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas", por exemplo, milho, arroz, trigo, aveia, cevada, centeio, triticale, painço, sorgo, quinoa, amaranto, trigo sarra-ceno, grama de forragem, turfa, alfafa, algodão, açafoa, girassol, soja, cano-
10 la, colza, linho, amendoim, feijão, ervilha, lentilha, alfafa, alface, aspargo, alcachofra, aipo, cenoura, rabanete, repolho, couve galega, mostarda, bróco-lis, couve flor, couve de Bruxelas, nabo, couve rábano, pepino, melões, abóbora moranga, abóbora menina, cebola, alho-poró, chalotas, cebolinha, to-
15 mate, berinjela, pimenta, fisális, beterraba, acelga, espinafre, plantas orna-mentais, e árvores florestais. Em uma modalidade particularmente preferida, a semente híbrida não natural é semente de milho. Semente híbrida não natural produzida usando atividade humana que inclui qualquer uma das moda-
20 lidades do método são especificamente adicionalmente reivindicadas.

20 PLANTAS TRANSGÊNICAS INDUTIVAMENTE ESTÉREIS CONTENDO UM CONSTRUCTO DE DNA RECOMBINANTE

 Um aspecto independente dessa invenção inclui uma planta transgênica indutivamente estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um
25 sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da segunda planta
30 parental é induzível pela aplicação do herbicida à planta. Em uma modalidade, o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino e a esterilidade é macho esterilidade. Em outra modalidade, o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino e a esterilidade é fêmea esterilidade. Em uma modalidade

adicional, o tecido reprodutivo é tecido reprodutivo inclui um óvulo fertilizado, e a esterilidade resulta na falha de óvulo fertilizado se desenvolver para uma semente viável.

Em modalidades preferidas, a planta transgênica indutivamente estéril é uma planta de cultivo propagada por semente, por exemplo, milho, milho, arroz, trigo, aveia, cevada, centeio, tritcale, painço, sorgo, quinoa, amaranto, trigo sarraceno, grama de forragem, turfa, alfafa, algodão, açafroa, girassol, soja, canola, colza, linho, amendoim, feijão, ervilha, lentilha, alfafa, alface, aspargo, alcachofra, aipo, cenoura, rabanete, repolho, couve galega, mostarda, brócolis, couve flor, couve de Bruxelas, nabo, couve rábano, pepino, melões, abóbora moranga, abóbora menina, cebola, alho, alho-poró, chalotas, cebolinha, tomate, berinjela, pimenta, fisális, beterraba, acelga, espinafre, plantas ornamentais, e árvores florestais.

Constructos de DNA Recombinantes: a planta transgênica indutivamente estéril, fornecida por essa invenção tem no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da segunda planta parental é induzível pela aplicação do herbicida à planta. Esse constructo de DNA recombinante é útil para fazer cromossomos de planta, células, plantas e sementes transgênicos, que contêm tal constructo, todos os quais são particularmente úteis para a produção de semente híbrida.

Em várias modalidades dessa invenção, incluindo modalidades da planta transgênica indutivamente estéril, o constructo de DNA recombinante ainda inclui pelo menos um elemento selecionado a partir de: (a) um promotor de planta; (b) um elemento de supressão gênica; (c) um íntron; (d) um elemento de expressão gênica; (e) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante (f) DNA que transcreve um aptâmero de

RNA capaz de se ligar a um ligante e DNA que transcreve RNA regulatório capaz de regular a expressão de um gene alvo, caracterizado em que a regulação é dependente da conformação do RNA regulatório, e a conformação do RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do aptâmero de RNA, e (g) pelo menos uma borda de T-DNA. Esses e outros elementos (por exemplo, terminadores e DNA espaçador) úteis nessa invenção são descritos em detalhe abaixo sob os títulos "Promotores"; "Elementos de Supressão Gênica", "Íntrons", "Elementos de Expressão Gênica", "Aptâmeros", "Ligantes", "RNA regulatório", "Bordas de T-DNA". Terminadores", e "DNA espaçador" e em outros locais nessa descrição. Exemplos não limitantes de como esses vários elementos podem ser dispostos estão descritos nas **Figuras 1 e 2**. Técnicas para fazer e usar constructos de DNA recombinantes da invenção, para fazer células de planta transgênicas que contêm os constructos de DNA recombinantes e plantas, sementes e plantas de pro-
 10 gênie transgênicas derivadas delas, e para testar os efeitos de transcrever os constructos de DNA recombinantes, são descritos em detalhe sob os títulos "Fazendo e Usando Constructos de DNA Recombinantes", "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas" e em outros locais nessa descrição.

20 Promotores: geralmente, o constructo de DNA recombinante inclui um promotor operativamente ligado ao DNA capaz de ser transcrito. Promotores adequados incluem qualquer promotor que é capaz de transcrever DNA na célula de planta onde a transcrição é desejada. Promotores não constitutivos adequados para uso com os constructos de DNA recombinantes da invenção incluem promotores espacialmente específicos, promotores temporalmente específicos e promotores induzíveis. Promotores espacialmente específicos podem incluir promotores organela-, célula-, tecido-, ou órgão-específicos funcionais em uma planta (por exemplo, um promotor plastídeo-específico, raiz-específico, pólen-específico, ou semente-específico para suprimir a expressão do primeiro RNA alvo em plastídeos, raízes,
 25 pólen, ou sementes, respectivamente). Em muitos casos, um promotor semente-específico, embrião-específico, aleurona-específico, ou endosperma-específico é especialmente útil. Promotores temporalmente específicos po-

- dem incluir promotores que tendem a promover expressão durante certos estágios de desenvolvimento no crescimento ou ciclo reprodutivo de uma planta, ou durante momentos diferentes do dia e da noite, ou em diferentes estações em um ano. Promotores induzíveis incluem promotores induzidos
- 5 por químicos (por exemplo, químicos exógenos ou sintéticos assim como ferormônios endógenos e outras moléculas de sinalização) ou por condições ambientais tais como, mas não limitadas a, estresse biótico ou abiótico (por exemplo, falta de água ou seca, calor, frio, níveis de nutriente ou sal altos ou baixos, níveis de luz altos ou baixos, ou infecção por praga ou patógeno).
- 10 Um promotor expressão-específico também pode incluir promotores que são geralmente expressos constitutivamente mas em graus ou "forças" diferentes de expressão, incluindo promotores comumente tidos como "promotores fortes" ou como "promotores fracos". Pelo fato do sítio de reconhecimento de miRNA fornecer controle de expressão tecido-seletiva do RNA mensageiro,
- 15 em muitas modalidades preferidas o promotor é simplesmente um promotor constitutivo.

- Exemplos específicos não limitantes de promotores úteis em plantas incluem um promotor de opalina sintase isolado de T-DNA de *Agrobacterium*, e um promotor 35S de vírus do mosaico da couve flor, entre outros, assim como elementos promotores intensificados ou elementos promotores quiméricos, por exemplo, um promotor 35S de vírus do mosaico da couve flor (CaMV) intensificado ligado a um elemento intensificador (um íntron da proteína de choque térmico 70 de *Zea mays*). Muitos promotores expressão-específicos funcionais em plantas e úteis em aspectos da invenção
- 20 são conhecidos na técnica. Por exemplo, Patentes U.S. 5.837.848; 6.437.217 e 6.426.446 descrevem promotores específicos de raiz; Patente U.S. 6.433.252 descreve um promotor de oleosina L3 de milho; a Publicação de Pedido de Patente U.S. 2004/0216189 descreve um promotor para um gene nuclear de planta que codifica uma aldolase localizada em plastídeo;
- 25 Patente U.S. 6.084.089 descreve promotores induzíveis pelo frio; Patente U.S. número 6.140.078 descreve promotores induzíveis por sal; Patente U.S. 6.294.714 descreve promotores induzíveis por luz; Patente U.S. 6.252.138 descreve promotores induzíveis por patógeno; e Publicação de Pedido de
- 30

Patente U.S. 2004/0123347 A1 descreve promotores induzíveis por falta de água.

- O elemento promotor pode incluir seqüências de ácido nucléico que são promotores ou elementos promotores ou homólogos desses de ocorrência não natural, mas que podem regular a expressão de um gene. Exemplos de tais seqüências regulatórias "independentes de gene" incluem seqüências de RNA de ocorrência natural ou desenhadas artificialmente que incluem uma região de ligação a um ligante ou aptâmero e uma região regulatória (que pode ser cis-atuante ou transatuante). Vide, por exemplo, Isaacs *et al.* (2004) *Nat. Biotechnol.*, 22:841-847, Bayer & Smolke (2005) *Nature Biotechnol.*, 23:337-343, Mandal & Breaker (2004) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:451-463, Davidson & Ellington (2005) *Trends Biotechnol.*, 23:109-112, Winkler *et al.* (2002) *Nature*, 419:952-956, Sudarsan *et al.* (2003) *RNA*, 9:644-647, e Mandal & Breaker (2004) *Nature Struct. Mol. Biol.*, 11:29-35.
- Tais "riboreguladores" poderiam ser selecionados ou desenhados para especificidade espacial ou temporal específica, por exemplo, para regular a tradução do gene exógeno apenas na presença (ou ausência) de uma dada concentração do ligante apropriado.

- Elementos de supressão gênica: o elemento de supressão gênica pode ser DNA capaz de ser transcrito de qualquer extensão adequada, e incluirá geralmente pelo menos cerca de 19 a cerca de 27 nucleotídeos (por exemplo, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 nucleotídeos) para cada gene alvo que o constructo de DNA recombinante é planejado para suprimir. Em muitas modalidades o elemento de supressão gênica inclui mais do que 23 nucleotídeos (por exemplo, mais do que cerca de 30, cerca de 50, cerca de 100, cerca de 200, cerca 300, cerca de 500, cerca de 1000, cerca de 1500, cerca de 2000, cerca de 3000, cerca de 4000, ou cerca de 5000 nucleotídeos) para cada gene alvo que o DNA recombinante é planejado para suprimir. Genes alvo são descritos sob o título "Genes Alvo".

- Elementos de supressão gênica adequados úteis nos constructos de DNA recombinantes da invenção incluem pelo menos um elemento (e, em algumas modalidades, múltiplos elementos) selecionados a partir do grupo que consiste em:

(a) DNA que inclui pelo menos segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento de pelo menos um primeiro gene alvo;

5 (b) DNA que inclui múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento de pelo menos um primeiro gene alvo;

(c) DNA que inclui pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento de pelo menos um primeiro gene alvo;

10 (d) DNA que inclui múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento de pelo menos um primeiro gene alvo;

15 (e) DNA que transcreve RNA para suprimir pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de RNA duplo filamento e inclui pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo;

20 (f) DNA que transcreve RNA para suprimir pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de um RNA duplo filamento e inclui múltiplos segmentos seriados de DNA anti-sentido que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos seriados de DNA sentido que são pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo;

25 (g) DNA que transcreve RNA para suprimir pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de múltiplas duplos filamentos de RNA e inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA sentido que são pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, e em que os ditos múltiplos segmentos de DNA anti-sentido e os múltiplos segmentos de DNA sentido estão dispostos em uma série de repetições invertidas;

30 (h) DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA, preferivelmente um miRNA de planta;

(i) DNA que inclui nucleotídeos de um siRNA;

(j) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se

ligar a um ligante; e

- (k) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante, e DNA que transcreve RNA regulatório capaz de regular a expressão de pelo menos um primeiro gene alvo, em que a regulação é dependente da conformação do RNA regulatório, e a conformação do RNA regulatório é alostericamente afetada pelo estado de ligação do aptâmero de RNA.

Representações não limitantes desses elementos de supressão gênica são ilustradas na **Figura 2**. Qualquer um desses elementos de supressão gênica, transcrevendo para um único RNA duplo filamento ou para múltiplos RNAs duplo filamento, podem ser desenhados para suprimir mais de um gene alvo, incluindo, por exemplo, mais de um alelo de um gene alvo, múltiplos genes alvo (ou múltiplos segmentos de pelo menos um gene alvo) de uma única espécie, ou genes alvo de espécies diferentes. Aptâmeros, RNA regulatório, e ligantes são descritos sob seus respectivos títulos abaixo.

Segmentos de DNA anti-sentido: em uma modalidade, o pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo inclui seqüência de DNA que é anti-sentido ou complementar a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, e pode incluir múltiplos segmentos de DNA anti-sentido, isto é, múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo. Múltiplos segmentos de DNA anti-sentido podem incluir seqüência de DNA que é anti-sentido ou complementar a múltiplos segmentos do pelo menos um primeiro gene alvo, ou a múltiplas cópias de um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, ou a segmentos de múltiplos primeiros genes alvo, ou a qualquer combinação desses. Múltiplos segmentos de DNA anti-sentido podem ser fundidos em uma quimera, por exemplo, que inclui seqüências de DNA que são anti-sentido a múltiplos segmentos de um ou mais primeiros genes alvo e fundidas juntas.

A seqüência de DNA anti-sentido que é anti-sentido ou complementar a (isto é, pode formar pares de base de Watson Crick com) pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo tem preferivelmente

pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% de complementaridade a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo. Em uma modalidade preferida, a sequência de DNA que é anti-sentido ou complementar a

5 pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo tem entre cerca de 95% a cerca de 100% de complementaridade a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo. Onde o pelo menos um segmento de DNA anti-sentido inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido, o grau de complementaridade pode ser, mas não precisa ser, idênti-

10 co para todos os múltiplos segmentos de DNA anti-sentido.

Segmentos de DNA sentido: em outra modalidade, o pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo inclui sequência de DNA que corresponde a (isto é, tem uma sequência que é idêntica ou substancialmente idêntica a) pelo

15 menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, e pode incluir múltiplos segmentos de DNA sentido, isto é, múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA sentido que corresponde a (isto é, tem a sequência de nucleotídeo de) pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo. Múltiplos segmentos de DNA sentido podem incluir sequência de DNA

20 que é ou que corresponde a múltiplos segmentos do pelo menos um primeiro gene alvo, ou a múltiplas cópias de um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, ou a segmentos de múltiplos genes alvo, ou a qualquer combinação desses. Múltiplos segmentos de DNA sentido podem ser fundidos em uma quimera, isto é, podem incluir sequências de DNA que corres-

25 pondem a múltiplos segmentos de um ou mais primeiros genes alvo e fundidas juntas.

A sequência de DNA sentido que corresponde a pelo menos um segmento do gene alvo tem preferivelmente pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos

30 cerca de 95% de identidade de sequência a pelo menos um segmento do gene alvo. Em uma modalidade preferida, a sequência de DNA que corresponde a pelo menos um segmento do gene alvo tem entre cerca de 95% a cerca de 100% de identidade de sequência a pelo menos um segmento do

gene alvo. Onde o pelo menos um segmento de DNA sentido inclui múltiplos segmentos de DNA sentido, o grau de identidade de seqüência pode, mas não precisa, ser idêntico para todos os múltiplos segmentos de DNA sentido.

Múltiplas cópias: onde o elemento de supressão gênica inclui

5 múltiplas cópias de seqüência de DNA anti-sentido ou múltiplas de seqüência de DNA sentido, essas múltiplas cópias podem ser dispostas seriadamente em repetições em tandem. Em algumas modalidades, essas múltiplas cópias podem ser dispostas seriadamente extremidade-para- extremidade, isto é, em repetições em tandem conectadas diretamente. Em algumas mo-

10 dalidades, essas múltiplas cópias podem ser dispostas em repetições em tandem interrompidas, onde um ou mais segmentos de DNA espaçador podem estar localizados adjacentes a uma ou mais das múltiplas cópias. Repetições em tandem, conectadas diretamente ou interrompidas ou qualquer combinação de ambas, podem incluir múltiplas cópias de uma única se-

15 qüência de DNA anti-sentido ou múltiplas cópias de uma única seqüência de DNA sentido em uma disposição seriada ou pode incluir múltiplas cópias de mais de uma seqüência de DNA anti-sentido ou de mais de uma seqüência de DNA sentido em uma disposição seriada.

RNA duplo filamento: nessas modalidades em que o elemento

20 de supressão gênica inclui pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um gene alvo ou pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um gene alvo, RNA transcrito a partir de qualquer um dos pelo menos um DNA anti-sentido ou pelo menos um DNA sentido pode se

25 tornar duplo filamento pela ação de uma RNA polimerase dependente de RNA. Vide, por exemplo, Patente U.S. número 5.283.184.

Em outras modalidades ainda, o elemento de supressão gênica pode incluir DNA que transcreve RNA para suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de RNA duplo filamento e inclui pelo menos um

30 segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um gene alvo (como descrito acima sob o título "Segmentos de DNA Anti-sentido") e pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo (como des-

crito acima sob o título "Segmentos de DNA Sentido"). Tal elemento de supressão gênica pode incluir adicionalmente segmentos de DNA espaçador. Cada pelo menos um segmento de DNA anti-sentido é complementar a pelo menos uma parte de um segmento de DNA sentido a fim de permitir a formação de RNA duplo filamento por hibridização intramolecular do pelo menos um segmento de DNA anti-sentido e o pelo menos um segmento de DNA sentido. Tal complementaridade entre um segmento de DNA sentido e um segmento de DNA anti-sentido pode, mas não precisa ser, 100% de complementaridade; em algumas modalidades, essa complementaridade pode ser preferivelmente de pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% de complementaridade.

O RNA duplo filamento pode estar na forma de um único "stem" de dsRNA (região de pareamento de base entre fitas sentido e anti-sentido), ou pode ter múltiplos "stems" de dsRNA. Em uma modalidade, o elemento de supressão gênica pode incluir DNA que transcreve RNA para suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo por formar essencialmente um único RNA duplo filamento e inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido seriados que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA sentido seriados que são pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo; os múltiplos segmentos anti-sentido seriados e múltiplos segmentos sentido seriados podem formar um único "stem" ou múltiplos "stems" de RNA duplo filamento em uma disposição seriada (com ou sem DNA espaçador sem pareamento de base separando os múltiplos "stems"). Em outra modalidade, o elemento de supressão gênica inclui DNA que transcreve RNA para suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo por formar múltiplos "stems" de dsRNA de RNA e inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA sentido que são pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, e em que os ditos múltiplos segmentos de DNA anti-sentido e os múltiplos segmentos de DNA sentido são dispostos em uma série de "stems" de dsRNA (tal como, mas não limitado a "repetições inverti-

das"). Tais múltiplos "stems" de dsRNA podem ainda ser dispostos em séries ou grupos para formar repetições invertidas em tandem, ou estruturas que lembram formatos de "cabeça de martelo" ou "folha de trevo". Qualquer um desses elementos de supressão gênica pode ainda incluir segmentos de DNA espaçadores encontrados dentro de um "stem" de dsRNA (por exemplo, como um espaçador entre múltiplos segmentos de DNA anti-sentido e sentido ou como um espaçador entre um segmento de DNA anti-sentido e um segmento de DNA sentido com pareamento de base) ou fora de um "stem" de RNA duplo filamento (por exemplo, como uma região de alça separando um par de repetições invertidas). Em casos onde segmentos de DNA anti-sentido e sentido com pareamento de base são de comprimento desigual, o segmento mais comprido pode agir como um espaçador. A **Figura 2** representa ilustrações de modalidades possíveis desses constructos de supressão gênica.

miRNAs: em uma modalidade adicional, o elemento de supressão gênica pode incluir DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA (microRNA), isto é, uma sequência de DNA que corresponde a um miRNA nativo a um vírus ou um eucarioto de interesse (incluindo plantas e animais, especialmente invertebrados), ou uma sequência de DNA derivada de tal miRNA nativo mas modificada para incluir sequências de nucleotídeo que não correspondem ao miRNA nativo. Embora miRNAs não tenham sido relatados até o momento em fungos, miRNAs de fungos, que devem existir, também são adequados para uso na invenção. Uma modalidade preferida inclui um elemento de supressão gênica que contém DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA viral ou de planta.

Em um exemplo não limitante, os nucleotídeos derivados de um miRNA podem incluir DNA que inclui nucleotídeos que correspondem a região de alça de um miRNA nativo e nucleotídeos derivados de um miRNA podem incluir DNA derivado de uma sequência precursora de miRNA, tal como sequência de primRNA ou pré-miRNA nativa, ou nucleotídeos que correspondem às regiões de um miRNA nativo e nucleotídeos que são selecionados a partir de um número de sequência de gene alvo tal que a estrutura geral (por exemplo, a colocação de não pareamentos na estrutura base do

pré-miRNA) seja preservada para permitir que o pré-miRNA seja processado em um miRNA maduro. Em outra modalidade ainda, o elemento de supressão gênica pode incluir DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA e é capaz de induzir ou guiar clivagem *in-phase* de um transcrito endógeno em siRNAs transatuantes, como descrito por Allen *et al.* (2005) *Cell*, 121:207-221. Dessa forma, o DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA pode incluir seqüência de ocorrência natural em um miRNA ou uma molécula precursora de miRNA, seqüência sintética, ou ambas.

siRNAs: ainda em outra modalidade, o elemento de supressão gênica pode incluir DNA que inclui nucleotídeos de um pequeno RNA de interferência (siRNA). O siRNA pode ser um ou mais siRNAs nativos (tais como siRNAs isolados de um eucarioto não transgênico ou de um eucarioto transgênico), ou pode ser uma ou mais seqüências de DNA previstas para ter atividade de siRNA (tal como pelo uso de ferramentas preditivas conhecidas na técnica, vide, por exemplo, Reynolds *et al.* (2004) *Nature Biotechnol.*, 22:326-330). Múltiplas seqüências de siRNA nativas ou previstas podem ser unidas em uma seqüência de siRNA quimérica para supressão gênica. Tal DNA que inclui nucleotídeos de um siRNA preferivelmente inclui pelo menos 19 nucleotídeos, e em algumas modalidades preferivelmente inclui pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, ou pelo menos 24 nucleotídeos. Em outras modalidades, o DNA que inclui nucleotídeos de um siRNA pode conter substancialmente mais de 21 nucleotídeos, por exemplo, mais de cerca de 50, cerca de 100, cerca de 300, cerca de 500, cerca de 1000, cerca de 3000, ou cerca de 5000 nucleotídeos ou mais.

Genes alvo: o elemento de supressão gênica pode ser projetado para suprimir qualquer primeiro gene alvo. Em algumas modalidades, o constructo ainda inclui um segundo elemento de supressão gênica para suprimir pelo menos um segundo gene alvo, em que o segundo elemento de supressão gênica está localizado adjacente ao íntron. Seja um primeiro ou um segundo gene alvo, o gene alvo pode incluir um único gene ou parte de um único gene que é direcionado para supressão ou pode incluir, por exemplo, múltiplos segmentos consecutivos de um gene alvo, múltiplos segmentos não consecutivos de um gene alvo, múltiplos alelos de um gene alvo, ou

múltiplos genes alvo de uma ou mais espécies.

O gene alvo pode ser sequência traduzível (codificante), ou pode ser sequência não codificante (tal como sequência regulatória não codificante), ou ambas, e pode incluir pelo menos um gene selecionado a partir do grupo que consiste em um gene alvo eucariótico, um gene alvo não eucariótico, uma sequência de DNA precursora de microRNA, e um promotor de microRNA. O gene alvo pode ser nativo (endógeno) à célula, (por exemplo, uma célula de uma planta ou animal) na qual o constructo de DNA recombinante da invenção é transcrito. O gene alvo pode ser um gene exógeno, tal como um transgene em uma planta. Um gene alvo pode ser um gene nativo direcionado para supressão, com ou sem expressão concomitante de um transgene exógeno, por exemplo, pela inclusão de um elemento de expressão gênica no mesmo constructo de DNA recombinante ou em constructo de DNA recombinante separado. Por exemplo, pode ser desejável substituir um gene nativo por um transgene exógeno homólogo.

O gene alvo pode incluir um único gene ou parte de um único gene que é direcionado para supressão, ou pode incluir, por exemplo, múltiplos segmentos consecutivos de um gene alvo, múltiplos segmentos não-consecutivos de um gene alvo, múltiplos alelos de um gene alvo, ou múltiplos genes alvo de uma ou mais espécies. Uma sequência de gene alvo pode incluir qualquer sequência de qualquer espécie (incluindo, mas não limitada, a não-eucariotos tais como bactérias, e vírus; fungos, plantas; incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como plantas de cultivo, plantas ornamentais, e plantas não-domesticadas ou selvagens; invertebrados tais como artrópodes, anelídeos, nematódeos, e moluscos; e vertebrados tais como anfíbios, peixes, aves, mamíferos domésticos ou selvagens, ou até mesmo humanos.

Um aspecto da invenção fornece constructos de DNA recombinante em que o gene alvo é exógeno à planta na qual o constructo deve ser transcrito, mas endógeno a uma praga ou patógeno (por exemplo, vírus, bactérias, fungos, oomicetos, e invertebrados tais como insetos, nematódeos e moluscos) da planta. O gene alvo pode incluir múltiplos gene alvo, ou múltiplos segmentos de um ou mais genes. Em uma modalidade preferida, o

gene ou genes alvo são um gene ou genes de uma praga ou patógeno invertebrado da planta. Esses constructos de DNA recombinantes são particularmente úteis em fornecer plantas transgênicas que têm resistência a uma ou mais pragas ou patógenos de planta, por exemplo, resistência a um nemató-
 5 deo tal como um nematódeo de cisto de soja ou nematódeo de nó de raiz ou a um inseto nocivo.

O gene alvo pode ser sequência traduzível (codificante), ou pode ser sequência não-codificante (tal como uma sequência regulatória não-codificante), ou ambas. Exemplos não limitantes de um gene alvo incluem
 10 sequência não-traduzível (não-codificante), tal como, mas não limitada a, regiões 5' não traduzidas, promotores, intensificadores, ou outras regiões transcricionais não-codificantes, regiões 3' não traduzidas, terminadores e íntrons. Genes alvo incluem genes que codificam microRNAs, pequenos RNAs de interferência, componentes de RNA de ribossomos ou ribozimas,
 15 pequenos RNAs nucleolares, e outros RNAs não-codificantes (vide, por exemplo, seqüências de RNA não-codificantes fornecidas publicamente em rfam.wustl.edu; Erdmann *et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:189-193; Gottesman (2005) *Trends Genet.*, 21:399-404; Griffiths-Jones *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:121-124). Um exemplo específico de um gene alvo inclui
 20 um sítio de reconhecimento de microRNA (isto é, o sítio um um filamento de RNA a qual miRNA maduro se liga e induz clivagem). Outro exemplo específico de um gene alvo inclui uma seqüência precursora de microRNA nativa a uma praga ou patógeno da planta transgênica, isto é, o transcrito primário que codifica um microRNA, ou os intermediários de RNA processados a par-
 25 tir desse transcrito primário (por exemplo, um primRNA ou um pré-miRNA limitado ao núcleo que pode ser exportado a partir do núcleo para o citoplasma). Vide, por exemplo, Lee *et al.* (2002) *EMBO Journal*, 21:4663-4670; Reinhart *et al.* (2002) *Genes & Dev.*, 16:1616-1626; Lund *et al.* (2004) *Science*, 303:95-98; e Millar & Waterhouse (2005) *Funct. Integr Genomics*,
 30 5:129-135. Genes alvo também podem incluir seqüência traduzível (codificante) para genes que codificam fatores de transcrição e genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese ou catabolismo de moléculas de interesse (tais como, mas não limitadas a, aminoácidos, ácidos graxos, e ou-

tros lipídeos, açúcares, e outros carboidratos, polímeros biológicos, e metabólitos secundários incluindo alcalóides, terpenóides, policetídeos, peptídeos não-ribossomais, e metabólitos secundários de origem biossintética mista).

Em muitas modalidades preferidas, o gene alvo é um gene essencial da praga ou patógeno de planta. Genes essenciais incluem genes que são necessários para o desenvolvimento da praga ou patógeno para um adulto reprodutivo fértil. Genes essenciais incluem genes que, quando silenciados ou suprimidos, resultam na morte do organismo (como um adulto ou em qualquer estágio do desenvolvimento, incluindo gametas) ou na incapacidade do organismo de reproduzir com sucesso (por exemplo, esterilidade em um parente masculino ou feminino ou letalidade ao zigoto, embrião ou larva). Uma descrição de genes essenciais de nematódeo é encontrada, por exemplo, em Kempthues K. "Essential Genes" (24 de dezembro de 2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.57.1, disponível na rede em www.wormbook.org. Exemplos não limitantes de genes essenciais de nematódeos incluem proteína de esperma major, RNA polimerase II, e quitina sintase (vide, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente U.S. US20040098761 A1); genes essenciais de nematódeo de cisto de soja adicionais são fornecidos no Pedido de Patente U.S. 11/360,355, depositado em 23 de fevereiro de 2006. Uma descrição de genes de inseto está disponível publicamente na base de dados de genoma de *Drosophila* (disponível na rede em flybase.bio.indiana.edu/). A maioria dos genes de *Drosophila* previstos foi analisada quanto à função por um rastreamento de RNA de interferência baseado em cultura celular, resultando em 438 genes essenciais sendo identificados; vide, Boutros *et al.* (2004) *Science*, 303:832-835, e material de suporte disponível na rede em www.sciencemag.org/cgi/content/full/303/5659/832/DC1. Uma descrição de genes essenciais bacterianos ou fúngicos é fornecida na Base de Dados de Genes Essenciais ("DEG", disponível na rede em tubic.tju.edu.cn/deg/); vide Zhang *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:D271-D272.

Invertebrados nocivos de planta incluem, mas não são limitadas a, nematódeos nocivos, moluscos nocivos (lesmas e caracóis), e insetos nocivos. Patógenos de planta de interesse incluem fungos, oomicetos, bacté-

rias (por exemplo, a bactéria que causa manchas foliares, "fireblight", galha da coroa, e murcha bacteriana), mollicutes, e vírus (por exemplo, os vírus que causam mosaicos, bandeamento de nervuras, nódoas, manchas, ou crescimento anormal). Vide também G. N. Agrios, "Plant Pathology" (Quarta Edição), Academic Press, San Diego, 1997, 635 pp., para descrições de fungos, bactérias, mollicutes (incluindo micoplasmas e espiroplasmas), vírus, nematódeos, plantas parasitas superiores, e protozoários flagelados, todos os quais são pragas ou patógenos de planta de interesse. Vide também, a compilação continuamente atualizada de pragas e patógenos de planta e as doenças causadas por eles em "Common Names of Plant Diseases", da American Phytopathological Society compilados pelo Committee on Standardization of Common Names for Plant Diseases da American Phytopathological Society, 1978-2005, disponível na rede em www.apsnet.org/online/common/top.asp.

Exemplos não limitantes de patógenos de planta fúngicos de interesse particular incluem, por exemplo, os fungos que causam oídio, ferrugem, nódoa e macha foliar, tombamento, podridão da raiz, podridão da coroa, podridão da cápsula de algodão, cancro da haste, cancro do galho, murcha vascular, fuligem, mofo, incluindo, mas não limitado a, *Fusarium* spp., *Phakospora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Aspergillus* spp., *Gibberella* spp., *Pyricularia* spp., e *Alternaria* spp.. Exemplos específicos de patógenos de planta fúngicos incluem *Phakospora pachirhizi* (ferrugem asiática da soja), *Puccinia sorghi* (ferrugem comum do milho), *Puccinia polysora* (ferrugem do Sul do milho), *Fusarium oxysporum* e outros *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Exserohilum turcicum* (mancha foliar do milho do Norte), *Bipolaris maydis* (mancha foliar do milho do Sul), *Ustilago maydis* (fuligem do milho), *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*), *F. proliferatum* (*G. fujikuroi* var. *intermedia*), *F. subglutinans* (*G. subglutinans*), *Diplodia maydis*, *Sporisorium holci-sorghi*, *Colletotrichum graminicola*, *Setosphaeria turcica*, *Aureobasidium zeae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e as várias espécies de fungo fornecidas nas Tabelas 4 e 5 da Patente U. S. 6.194.636. Exemplos não limitantes de patógenos de planta incluem patógenos anteriormente classificados como

fungos, mas mais recentemente classificados como oomicetos. Exemplos específicos de oomicetos patógenos de planta de interesse particular incluem membros do gênero *Pythium* (por exemplo, *Pythium aphanidermatum*) e *Phytophthora* (por exemplo, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*,) e

5 organismos que causam mildio (por exemplo, *Peronospora farinosa*).

Exemplos não limitantes de patógenos bacterianos incluem os micoplasmas que causam amarelos e espiroplasmas tais como *Spiroplasma kunkelii*, que causa enfezamento do milho, eubactérias tais como *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas andropogonis*, *Erwinia stewartii*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xylella fastidiosa*, e as várias espécies bacterianas listadas na Tabela 3 da Patente U.S. 6.194.636.

10

Exemplos não limitantes de patógenos de planta virais de interesse particular incluem vírus do nanismo mosaico do milho (MDMV), vírus do mosaico da cana-de-açúcar, (SCMV, anteriormente MDMV cepa B), vírus do mosaico do estriado do trigo (*wheat streak mosaic virus*, WSMV), vírus do nanismo clorótico do milho (*maize chlorotic dwarf virus* (MCDV), vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV), vírus da doença do cacho de banana (BBTV) e os vários vírus listados na Tabela 2 da Patente U.S. 6.194.636.

15

Pragas invertebradas de interesse particular, especialmente em,

20 mas não limitado a, regiões do hemisfério sul (incluindo América do Sul e Central) incluindo afídeos, lagarta da raiz, spodoptera, noctuidae, besouro da batata, *Lygus* spp., qualquer hemíptero, ou homópteros, ou heteróptero, qualquer lepidóptero, qualquer coleóptero, nematódeos, lagartas da traça, lagarta da espiga, lagarta do cartucho, brocas, lagarta enroladeira, e outros.

25 Pragas artrópodes especificamente abrangidas por essa invenção incluem várias espécies de lagarta incluindo lagarta (*Agrotis repleta*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta (*Anicla ignicans*), lagarta granulada (*Feltia subterranea*), "gusano áspero" (*Agrotis malefida*); traça da farinha Mediterrânea (*Anagasta kuehniella*), besouro "square-necked grain beetle" (*Cathartus quadricollis*), besouro saltador (flea beetle) (*Chaetocnema* spp), traça (*Corcyra cephalonica*), lagarta da raiz do milho ou "vaquita de San Antonio" (*Diabrotica speciosa*), broca da cana de açúcar (*Diatraea saccharalis*), broca do colo (*Elasmopalpus lignosellus*), percevejo marrom (*Euschistus* spp.), lagarta da

30

espiga de milho (*Helicoverpa zea*), besouro do grão (*Laemophloeus minutus*), curuquerê dos capinzais (*Mocis latipes*), besouro (*Oryzaephilus surinamensis*), traça da farinha (*Pyralis farinalis*), traça indiana da farinha (*Plodia interpunctella*), pulgão do milho (*Rhopalosiphum maidis*), percevejo castanho ou "chinche subterrânea" (*Scaptocoris castanea*), pulgão verde (*Schizaphis graminum*), caruncho dos cereais (*Sitophilus zeamais*), tínea dos cereais (*Sitotroga cerealella*), lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), besouro (cadelle beetle) (*Tenebroides mauritanicus*), ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), besouro castanho das farinhas (*Triboleum castaneum*), lagarta das

10 folhas do algodoeiro (*Alabama argillacea*), gorgulho do algodão (*Anthonomus grandis*), pulgão do algodão (*Aphis gossypii*), mosca branca da batata doce (*Bemisia tabaci*), várias espécies de tripes (*Frankliniella* spp.), lagarta do algodão (*Helicoverpa zea*), "oruga bolillera" (por exemplo, *Helicoverpa geletopoeon*), lagarta da maçã (*Heliothis virescens*), percevejo verde (*Nezara viridula*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), lagarta do cartucho (*Spodoptera exigua*), ácaros (*Tetranychus* spp.), tripes da cebola (*Thrips tabaci*), mosca branca das estufas (*Trialeurodes vaporariorum*), lagarta desfolhadora (*Anticarsia gemmatilis*), besouro machado do milho ou "astilo moteado" (*Astilus atromaculatus*), "oruga de la alfalfa" (*Colias lesbia*), "chinche

20 marrom" ou "chinche de los cuernos" (*Dichelops furcatus*), "alquiche chico" (*Edessa miditabunda*), besouros da bolha (*Epicauta* spp.), "barrenador del brote" (*Epinotia aporema*), "oruga verde del yuyo colorado" (*Loxostege bifidalis*), nematódeos "root-knot" (*Meloidogyne* spp.), "oruga cuarteadora" (*Mocis repanda*), percevejo verde do sul (*Nezara viridula*), "chinche de la alfalfa" (*Piezodorus guildinii*), lagarta verde (green cloverworm) (*Plathypena scabra*), lagarta da soja (*Pseudoplusia includens*), lagarta "isoca medidora del girasol" (*Rachiplusia nu*), "yellow woollybear" (*Spilosoma virginica*), lagarta do cartucho listrada amarela (*Spodoptera ornithogalli*), vários gorgulhos da raiz (família Curculionidae), vários "wireworms" (família Elateridae), e vários corós

25 (família Scarabaeidae). Pragas nematódeas especificamente abrangidas por essa invenção incluem pragas de milho (*Belonolaimus* spp., *Trichodorus* spp., *Longidorus* spp., *Dolichodorus* spp., *Anguina* spp., *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp.), soja (*Heterodera glycines*, *Meloidogyne*

30

spp., *Belonolaimus* spp.), bananas (*Radopholus similis*, *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* spp.), cana de açúcar (*Heterodera sacchari*, *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp.), laranjas (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp.), café (*Meloidogyne* spp.,
 5 *Pratylenchus* spp.), coqueiro (*Bursaphelenchus* spp.), tomates (*Meloidogyne* spp., *Belonolaimus* spp., *Nacobbus* spp.), uvas (*Meloidogyne* spp., *Xiphinema* spp., *Tylenchulus* spp., *Criconemella* spp.), limão e lima (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp.), cacau (*Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*), abacaxi (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Rotylenchulus reniformis*), mamão (*Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*), toranja (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp., e favas (*Meloidogyne* spp.).

Genes alvo de pragas podem incluir genes de invertebrados para
 15 ra proteína major de esperma, alfa tubulina, beta tubulina, ATPase vacuolar, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, RNA polimerase II, quitina sintase, citocromos, miRNAs, moléculas precursoras de miRNA, promotores de miRNA, assim como outros genes tais como aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. 2006/0021087 A1, Pedido de Patente PCT
 20 PCT/US05/11816, e na Tabela II da Publicação de Pedido de Patente U. S. 2004/0098761 A1. Genes alvo de patógenos podem incluir genes para fatores de iniciação de tradução viral, replicases virais, miRNAs, moléculas precursoras de miRNA, tubulina fúngica, ATPase vacuolar fúngica, quitina sintase fúngica, MAP quinases fúngicas, Pac1 Tyr/Thr fosfatase fúngica, enzi-
 25 mas envolvidas no transporte de nutrientes (por exemplo, transportadores de aminoácidos ou transportadores de açúcares), enzimas envolvidas na biossíntese de parede celular fúngica, cutinases, melanina, enzimas biossintéticas, poligalacturonases, pectinases, pectina liases, celulasas, proteases, genes que interagem com genes de avirulência de planta, e outros genes
 30 envolvidos em invasão e replicação do patógeno na planta infectada. Dessa forma, um gene alvo não precisa ser endógeno à planta na qual o constructo de DNA recombinante é transcrito. Um constructo de DNA recombinante da invenção pode ser transcrito em uma planta e usado para suprimir um gene

de um patógeno ou praga que pode infestar a planta.

Exemplos não limitantes específicos de genes alvo adequados também incluem genes catabólicos de aminoácidos (tais como, mas não limitados, ao gene *LKR/SDH* de milho que codifica lisina-cetoglutarato redutase (LKR) e sacaropina desidrogenase (SDH), e seus homólogos), genes de zeína de milho, genes envolvidos na síntese de ácido graxo (por exemplo, desaturasas de ácido graxo microsomal e tioesterases de acil-ACP de planta, tais como, mas não limitadas, àquelas descritas nas Patentes U.S. números 6.426.448, 6.372.965, e 6.872.872), genes envolvidos em vias de biossíntese multi-etapa, onde pode ser de interesse regular o nível de um ou mais intermediários, tal como genes que codificam enzimas para biossíntese de poliidroxialcanoato (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.750.848); e genes que codificam proteínas de controle do ciclo celular, tal como proteínas com atividade semelhante a inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) (vide, por exemplo, genes descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional número WO 05007829A2). Genes alvo podem incluir genes que codificam proteínas indesejáveis (por exemplo, alérgenos ou toxinas) ou as enzimas para a biossíntese de compostos indesejáveis (por exemplo, componentes de sabor ou odor indesejável). Dessa forma, uma modalidade da invenção é uma planta transgênica ou tecido de tal planta que é melhorado pela supressão de proteínas alergênicas ou toxinas, por exemplo, uma semente de amendoim, soja, trigo com alergenicidade diminuída. Genes alvo podem incluir genes envolvidos na maturação de frutos, tal como poligalacturonase. Genes alvo podem incluir genes onde a expressão é preferivelmente limitada a uma célula ou tecido ou estágio de desenvolvimento particular, ou onde a expressão é preferivelmente transitória, isto quer dizer, onde supressão constitutiva ou geral, ou supressão que se espalha por muitos tecidos, não é necessariamente desejada. Dessa forma, outros exemplos de genes alvo adequados incluem genes que codificam proteínas que, quando expressas em plantas transgênicas, fazem as plantas transgênicas resistentes a pragas ou patógenos (vide, por exemplo, genes para colesterol oxidase como descrito na Patente U.S. No. 5.763.245); genes onde a expressão é induzida pela praga ou patógeno; e genes que podem induzir ou

restaurar fertilidade (vide, por exemplo, genes *barstar/barnase* descritos na Patente U.S. No. 6.759.575).

Os constructos de DNA recombinantes da invenção podem ser projetados para suprimir mais especificamente o gene alvo, por desenhar o elemento ou elementos de supressão gênica para incluir regiões substancialmente não idênticas a uma seqüência de gene não-alvo. Genes não-alvo podem incluir qualquer gene que não se pretende silenciar ou suprimir, tanto em uma planta que transcreve o constructo de DNA recombinante como em organismos que podem entrar em contato com RNA transcrito a partir do constructo de DNA recombinante. Uma seqüência de gene não-alvo pode incluir qualquer seqüência de qualquer espécie (incluindo, mas não limitada a, não-eucariotos tal como bactérias, e vírus; fungos, plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, tal como plantas de cultivo, plantas ornamentais, e plantas selvagens ou não-domesticadas; invertebrados tais como artrópodes, anelídeos, nematódeos, e moluscos; e vertebrados tais como anfíbios, peixe, aves, mamíferos domésticos ou selvagens, e até mesmo seres humanos).

Em uma modalidade, o gene alvo é um gene endógeno para uma dada espécie, tal como uma dada planta (tal como, mas não limitado a, plantas agricolamente ou comercialmente importantes, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas), e o gene não-alvo pode ser, por exemplo, um gene de uma espécie não-alvo, tal como outra espécie de planta ou um gene de um vírus, fungo, bactéria, invertebrado, ou vertebrado, até mesmo um ser humano. Um exemplo não limitante é onde o elemento de supressão gênica é projetado para suprimir um gene alvo que é um gene endógeno para uma única espécie (por exemplo, lagarta da raiz do milho Ocidental, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) mas não suprime um gene não-alvo tal como os genes de espécies relacionadas, até mesmo intimamente relacionadas (por exemplo, lagarta da raiz do milho do Norte, *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence, ou lagarta da raiz do milho do Sul, *Diabrotica undecimpunctata*).

Em outras modalidades (por exemplo, onde é desejável suprimir um gene alvo entre múltiplas espécies), pode ser desejável desenhar o elemento de supressão gênica para suprimir uma seqüência de gene alvo co-

5 mum às múltiplas espécies nas quais o gene alvo deve ser silenciado. Dessa forma, um elemento de supressão gênica pode ser selecionado para ser específico para um táxon (por exemplo, específico para um gênero, família, ou mesmo um táxon maior tal como um filo, por exemplo, artrópodes), mas não para outros táxons (por exemplo, plantas ou vertebrados ou mamíferos). Em um exemplo não limitante dessa modalidade, um elemento de supressão gênica para silenciamento gênico pode ser selecionado a fim de atingir fungos patogênicos (por exemplo, um *Fusarium* spp.), mas não atingir qualquer outra sequência gênica de fungos benéficos.

10 Em outro exemplo não limitante dessa modalidade, um elemento de supressão gênica para silenciamento gênico em lagarta da raiz do milho pode ser selecionado para ser específico para todos os membros do gênero *Diabrotica*. Em um exemplo adicional dessa modalidade, tal elemento de supressão gênica direcionado para *Diabrotica* pode ser selecionado a fim de não atingir nenhuma sequência gênica de coleópteros benéficos (por exemplo, besouros coccinelídeos predatórios, comumente conhecidos como joaninhas) ou outras espécies de insetos benéficos.

O grau necessário de especificidade de um RNA para silenciar um gene alvo depende de vários fatores. Por exemplo, o RNA para silenciar um gene alvo inclui RNA duplo filamento (dsRNA), e assim fatores podem incluir o tamanho dos menores fragmentos de dsRNA que são esperados ser produzidos pela ação de proteínas Dicer ou semelhantes a Dicer, e a importância relativa de diminuir o potencial das dsRNAs suprimirem genes não-alvo. Por exemplo, onde se espera que os fragmentos de dsRNA tenham 21 pares de base de tamanho, uma modalidade particularmente preferida inclui RNA para silenciar um gene alvo que codifica regiões substancialmente não-idênticas a uma sequência de gene não-alvo, tais como regiões dentro das quais cada fragmento contíguo que inclui pelo menos pareamentos de 21 nucleotídeos de menos do que 21 (por exemplo, de menos do que 21, ou de menos do que 20, ou de menos do que 19, ou de menos do que 18, ou de menos do que 17) dos 21 nucleotídeos contíguos de uma sequência de gene não-alvo. Em outra modalidade, regiões substancialmente não idênticas a uma sequência gênica não-alvo inclui regiões dentro das quais cada frag-

mento contíguo que inclui pelo menos pareamentos de 19 nucleotídeos menores do que 19 (por exemplo, 19, ou menores do que 18, ou menores do que 17, ou menores do que 16) dos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de gene não-alvo.

- 5 Em algumas modalidades, pode ser desejável desenhar o RNA para silenciar um gene alvo para incluir regiões previstas para não gerar polipeptídeos indesejáveis, por exemplo, por rastrear o RNA para silenciar um gene alvo para seqüências que podem codificar polipeptídeos indesejáveis conhecidos ou homólogos próximos desses. Polipeptídeos indesejáveis incluem, mas não são limitados a, polipeptídeos homólogos a polipeptídeos alergênicos conhecidos e polipeptídeos homólogos a toxinas polipeptídicas conhecidas. Seqüências disponíveis publicamente que codificam tais peptídeos potencialmente alergênicos estão disponíveis, por exemplo, a base de dados de alergenos de Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) (disponível em allergenonline.com) ou as bases de dados Biotechnology Information for Food Safety Databases (disponível em www.iit.edu/~sgendel/fa.htm) (vide também, por exemplo, Gendel (1998) *Adv. Food Nutr. Res.*, 42:63-92). Seqüências indesejáveis também podem incluir, por exemplo, aquelas seqüências de polipeptídeo apontadas como
- 10 toxinas conhecidas ou como alergenos potenciais ou conhecidos e contidas em bases de dados publicamente disponíveis tais como GenBank, EMBL, SwissProt, e outras, que são pesquisáveis pelo sistema Entrez (www.ncbi.nih.gov/Entrez). Exemplos não limitantes de seqüências de peptídeos potencialmente alergênicos incluem glicinina de soja, oleosina e aglutina de amendoim, gluteninas de trigo, caseína, lactalbumina, e lactoglobulina de leite bovino e tropomiosina de vários moluscos (allergenonline.com). Exemplos não limitantes de peptídeos potencialmente tóxicos indesejáveis incluem toxina tetânica tetA de *Clostridium tetani*, toxinas diarréicas de *Staphylococcus aureus*, e venenos tais como conotoxinas de *Conus* spp. e neurotoxinas de artrópodes e reptéis (www.ncbi.nih.gov/Entrez).
- 15
- 20
- 25
- 30

Em um exemplo não limitante, um RNA para silenciar um gene alvo é rastreado para eliminar aquelas seqüências capazes de ser traduzidas que codificam polipeptídeos com homologia perfeita a um alergeno ou

toxina conhecida por 8 aminoácidos contíguos, ou com pelo menos 35% de identidade por pelo menos 80 aminoácidos; tais rastreamentos podem ser realizados em qualquer e todas as possíveis fases de leitura em ambas as direções, em fases abertas de leitura potenciais que começam com AUG (ATG no DNA correspondente), ou em todas as fases abertas de leitura possíveis, independente de se elas começam com um AUG (ou ATG) ou não. Quando um "acerto" ou pareamento é feito, isto é, quando uma sequência que codifica um polipeptídeo potencial com homologia perfeita a um alérgeno ou toxina conhecida por 8 aminoácidos consecutivos (ou pelo menos cerca de 35% de identidade por pelo menos cerca de 80 aminoácidos), é identificado, as seqüências de ácido nucléico que correspondem ao acerto podem ser evitadas, eliminadas, ou modificadas ao selecionar seqüências a ser usadas em um RNA para silenciar um gene alvo.

Evitar, eliminar, ou modificar uma seqüência indesejada pode ser obtido por qualquer um de vários métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Em alguns casos, o resultado pode ser novas seqüências que são acreditadas não existirem naturalmente. Por exemplo, evitar certas seqüências pode ser obtido por unir seqüências "limpas" em novas seqüências quiméricas para ser usadas em um RNA para silenciar um gene alvo.

Já que o RNA para silenciar um gene alvo inclui RNA duplo filamento (dsRNA), os requerentes reconhecem que em algum silenciamento mediado por dsRNA, é possível que seqüências de dsRNA que não pareiam perfeitamente sejam eficazes no silenciamento gênico. Por exemplo, foi mostrado que não pareamentos próximo ao centro de um sítio complementar de miRNA tem efeitos mais fortes sobre o silenciamento gênico do miRNA do que pareamentos localizados mais distalmente. Vide, por exemplo, Figura 4 em Mallory *et al.* (2004) *EMBO J.*, 23:3356-3364. Em outro exemplo, foi relatado que, tanto a posição de um par de base não pareado quanto a identidade dos nucleotídeos que formam o não pareamento influenciam a habilidade de um dado siRNA silenciar um gene alvo, e que não pareamentos adenina-citosina, além do par de base oscilante G:U, foram bem-tolerados (vide Du *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:1671-1677). Dessa forma, o dsRNA que está incluído no RNA para silenciar um gene alvo não precisa

sempre ter 100% de identidade de seqüência com o gene alvo pretendido, mas geralmente teria preferivelmente identidade de seqüência substancial com o gene alvo pretendido, tal como cerca de 95%, cerca de 90%, cerca de 85%, ou cerca de 80% de identidade de seqüência com o gene alvo pretendido. Um versado na técnica seria capaz de julgar a importância dada ao rastreamento por regiões previstas para ser mais altamente específicas ao gene alvo ou previstas para não gerar polipeptídeos indesejáveis, em relação à importância dada a outros critérios, tais como, mas não limitados a, porcentagem de identidade de seqüência com o gene alvo pretendido ou a eficiência de silenciamento gênico prevista de uma dada seqüência. Por exemplo, pode ser desejável para um RNA para silenciar um gene alvo ser ativo entre várias espécies e, portanto um versado na técnica pode determinar que é mais importante incluir no RNA para silenciar um gene alvo regiões específicas para as várias espécies de interesse, mas menos importante rastrear por regiões previstas para ter maior eficiência de silenciamento gênico ou para regiões previstas para gerar polipeptídeos indesejáveis.

Aptâmeros de RNA: aptâmeros de ácido nucléico são moléculas de ácido nucléico que se ligam a um ligante através de mecanismo de ligação que não é primariamente baseado em pareamento de base de Watson-Crick (ao contrário, por exemplo, ao pareamento de base que ocorre entre fitas de ácido nucléico complementares, anti-paralelas para formar uma estrutura de ácido nucléico duplo filamento). Vide, por exemplo, Ellington & Szostak (1990) *Nature*, 346:818-822. Um aptâmero de ácido nucléico geralmente inclui uma seqüência de nucleotídeo primária que permite que o aptâmero forme uma estrutura secundária (por exemplo, por formar estruturas "stem-loop") que permite que o aptâmero se ligue ao seu ligante. A ligação do aptâmero ao seu ligante é preferivelmente específica, permitindo ao aptâmero distinguir entre duas ou mais moléculas que são estruturalmente similares (vide, por exemplo, Bayer & Smolke (2005) *Nature Biotechnol.*, 23:337-343). Aptâmeros úteis na invenção podem, entretanto, ser monovalentes (se ligar a um único ligante) ou multivalentes (se ligar a mais de um ligante individual, por exemplo, se ligar a uma unidade de dois ou mais ligantes diferentes). Vide, por exemplo, Di Giusto & King (2004) *J. Biol. Chem.*,

279:46483-46489, que descreve o desenho e construção de aptâmeros de DNA circular, multivalentes.

Aptâmeros úteis na invenção podem incluir DNA, RNA, análogos de ácido nucléico (por exemplo, ácidos peptídeo nucléico), ácidos nucléicos bloqueados, ácidos nucléicos modificados quimicamente, ou combinações desses. Vide, por exemplo, Schmidt *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:5757-5765, que descrevem aptâmeros de ácido nucléico bloqueado. Em uma modalidade preferida da invenção, o aptâmero é um aptâmero de RNA. Em uma modalidade particularmente preferida, o aptâmero é produzido por transcrição *in planta*. Exemplos de aptâmeros podem ser encontrados, por exemplo, na Base de Dados de Aptâmero pública, disponível na rede em aptamer.icmb.utexas.edu (Lee *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32(1):D95-100).

Aptâmeros podem ser desenhados para um dado ligante por vários procedimentos conhecidos na técnica, incluindo técnicas de seleção *in vitro* ou de evolução direcionada. Vide, por exemplo, "SELEX" ("evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial"), como descrito em Tuerk & Gold (1990) *Science*, 249:505-510, Ellington & Szostak (1990) *Nature*, 346:818-822, Ellington & Szostak (1992) *Nature*, 355:850-852, seleção de aptâmeros de RNA bifuncionais por SELEX quimérico, como descrito por Burke & Willis (1998), *RNA*, 4:1165-1175, seleção usando ligantes ligados a partículas magnéticas como descrito por Murphy *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31:e110, uma técnica de SELEX automática descrita por Eulberg *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33(4):e45, e uma técnica semelhante a SELEX para obter aptâmeros criados contra moléculas recombinantes expressas sobre superfícies celulares, como descrito por Ohuchi *et al.* (2005) *Nucleic Acid Symposium Series*, 49:351-352. A seleção pode começar com um conjunto aleatório de RNAs, de um conjunto parcialmente estruturado de RNAs (vide, por exemplo, Davis & Szostak (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 11616-11621), ou a partir de um conjunto de RNAs degenerados (vide, por exemplo, Geiger *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24: 1029-1036). Modelos de estrutura secundária, dobramento, e comportamento de hibridização para uma dada sequência de RNA podem ser previstos usando algoritmos, por

exemplo, como descrito por Zuker (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31: 3406-3415. Dessa forma, aptâmeros para um dado ligante podem ser desenhados *de novo* usando seleção adequada. Um exemplo não limitante de desenho e seleção de aptâmero é descrito em detalhe em Weill *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:5045-5058, que descreve o isolamento de vários aptâmeros de ligação de ATP e seleção secundária de aptâmeros que se ligam a cordicepina (3' desoxiadenosina). Outro exemplo não limitante de desenho de aptâmero é dado em Huang & Szostak (2003) *RNA*, 9:1456-1463, que descrevem a evolução *in vitro* de novos aptâmeros com novas especificidades e novas estruturas secundárias a partir de um aptâmero inicial.

Ligantes: ligantes úteis na invenção podem incluir aminoácidos ou seus intermediários biossintéticos ou catabólicos, peptídeos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, carboidratos, ácidos graxos e outros lipídios, esteróides, terpenóides, hormônios, ácidos nucleicos, aromáticos, alcalóides, produtos naturais ou compostos sintéticos (por exemplo, corantes, farmacêuticos, antibióticos, herbicidas), íons inorgânicos, e metais, em qualquer molécula curta (ou parte de uma molécula) que podem ser reconhecidos e ser ligados por uma estrutura secundária de ácido nucleico por um mecanismo não primariamente baseado no pareamento de Watson-Crick. Dessa forma, o reconhecimento e ligação de ligante e aptâmero é análogo àquele de antígeno e anticorpo, ou de efector biológico e receptor. Ligantes podem incluir moléculas únicas (ou parte de uma molécula), ou uma combinação de duas ou mais moléculas (ou partes de uma molécula) e podem incluir um ou mais complexos macromoleculares (por exemplo, polímeros, bicamadas lipídicas, lipossomos, membranas celulares, ou outras estruturas celulares, ou superfícies celulares). Vide, por exemplo, Plummer *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:5602-5610, que descrevem seleção de aptâmeros que se ligam a um composto pequena molécula-proteína de superfície; Zhuang *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.*, 277:13863-13872, que descrevem a associação de proteínas de receptor do intestino médio de insetos com "rafts" de lipídios, o que afeta a ligação de endotoxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*; e Homann & Goring (1999) *Nucleic Acids Res.*, 27:2006-2014, que descrevem aptâmeros que se ligam a tripanossomas vivos.

Exemplos não limitantes de ligantes específicos incluem vitaminas tais como coenzima B₁₂ e tiamina pirofosfato, flavina mononucleotídeo, guanina, adenosina, S-adenosilmetionina, S-adenosilomocisteína, coenzima A, lisina, tirosina, dopamina, glicosamina-6-fosfato, cafeína, teofilina, antibió-

5 ticos tais como cloranfenicol e neomicina, herbicidas tais como glifosato e dicamba, proteínas que incluem proteínas de revestimento viral ou de fago e proteínas epidérmicas ou da superfície do trato digestivo, e RNAs que incluem RNA viral, RNAs de transferência (t-RNAs), RNA ribossomal (rRNA), e RNA polimerases tais como RNA polimerase dependente de RNA (RdRP).

10 Ligantes adequados para uso nessa invenção incluem as proteínas de receptor da borda em escova do intestino médio de inseto que são reconhecidas por endotoxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*. Vide, por exemplo, Knight *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.*, 270:17765- 17770, e Gill *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.*, 270:27277-27282, que descrevem o isolamento, identificação, e

15 clonagem de exemplos de tais proteínas receptoras; Gomez *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:28906-28912, e Daniel *et al.* (2002) *Appl. Env. Microbiol.*, 68:2106-2112, que descrevem técnicas para identificar epítomos de ligação de tais proteínas receptoras e para estudar suas afinidades de ligação; Jurat-Fuentes & Adang (2001) *Appl. Env. Microbiol.*, 67:323-329, e Jurat-

20 Fuentes *et al.* (2001), *Appl. Env. Microbiol.*, 67:872-879, que descrevem ensaios de ligação de receptor de endotoxina envolvendo ligação medida tanto por blots de membrana quando ressonância de plasma de superfície de vesículas da membrana da borda em escova a endotoxina. Outros exemplos de ligantes adequados aos quais aptâmeros de RNA da invenção se ligam

25 incluem receptores de esteróides, tais como receptores de estrogênio, receptores de androgênio, receptores de retinóides, e receptores de ecdisona (vide, por exemplo, Saez *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:14512-14517. Quando ligantes são moléculas receptoras ou complexos receptores, aptâmeros de RNA da invenção podem agir opcionalmente como antagonis-

30 tas ou agonistas. Uma classe de aptâmeros de RNA útil na invenção são "termoswitches" que não se ligam a um ligante mas são responsivos termicamente, isto quer dizer, a conformação do aptâmero é determinada pela temperatura. Vide, por exemplo, Quadro 3 in Mandal & Breaker (2004) *Natu-*

re *Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:451-463.

Um aptâmero pode ser descrito por seu estado de ligação, isto é, se o aptâmero está ligado (ou desligado) ao seu respectivo ligante. O sítio de ligação (ou domínio ou domínios de ligação tridimensional) de um aptâ-
 5 mero pode ser descrito como ocupado ou não ocupado pelo ligante. De forma semelhante, uma população de um dado aptâmero pode ser descrita pela fração da população que está ligada ou desligada do ligante. A afinidade de um aptâmero pelo seu ligante pode ser descrita em termos da taxa de associação (ligação) do aptâmero com o ligante e a taxa de dissociação do
 10 ligante do aptâmero, por exemplo, pela constante de associação de equilíbrio (K) ou pela sua recíproca, a constante de afinidade (K_a) como é bem-conhecido na técnica. Essas taxas podem ser determinadas por métodos similares àqueles comumente usados para determinar a cinética de ligação de ligantes e receptores ou antígenos e anticorpos, tais como, mas não limi-
 15 tados a, ensaios de equilíbrio, ensaios de competição, ressonância de plasma de superfície, e modelos preditivos. A afinidade de um aptâmero pelo seu ligante pode ser selecionada, por exemplo, durante a evolução *in vitro* do aptâmero, ou modificada adicionalmente por alterações à sequência primária do aptâmero, onde tais alterações podem ser guiadas por cálculos de
 20 energia de ligação ou por algoritmos, por exemplo, como descrito por Zuker (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31:3406-3415 ou Bayer & Smolke (2005) *Nature Biotechnol.*, 23:337-343.

O estado de ligação de um aptâmero preferivelmente determina pelo menos parcialmente a estrutura secundária (por exemplo, a formação de regiões duplo filamento ou filamento única) e a conformação tridimensio-
 25 nal do aptâmero. Em modalidades onde o DNA capaz de ser transcrito ainda inclui DNA que transcreve RNA regulatório capaz de regular a expressão de uma sequência alvo, o estado de ligação do aptâmero afeta alostericamente a conformação do RNA regulatório e assim a habilidade do RNA regulatório
 30 regular a expressão da sequência alvo.

Em uma modalidade preferida, o aptâmero (RNA transcrito) é flanqueado por DNA que transcreve RNA capaz de formar RNA duplo filamento (dsRNA). Em algumas dessas modalidades, o dsRNA é processado

por um mecanismo de RNAi (siRNA ou miRNA), por meio do qual o aptâmero é clivado do resto do transcrito. Em outras modalidades particularmente preferidas, as duas regiões de RNA transcritas que flanqueiam o aptâmero formam pelo menos parcialmente um "stem" de RNA duplo filamento entre elas, em que o aptâmero serve como um "espaçador" ou "alça" em uma estrutura "stem-loop"; tal arranjo é esperado aumentar a estabilidade ou meia-vida do transcrito de uma maneira análoga àquela observada para DNA (vide, por exemplo, Di Giusto & King (2004) *J. Biol. Chem.*, 279:46483-46489). Plantas transgênicas que têm no seu genoma DNA que transcreve tais aptâmeros que têm estabilidade aumentada são particularmente desejáveis, por exemplo, onde o aptâmero funciona para inibir ou matar um patógeno ou praga da planta transgênica.

RNA regulatório: em muitas modalidades, o DNA capaz de ser transcrito ainda inclui DNA que transcreve RNA regulatório capaz de regular a expressão de uma seqüência alvo em que a regulação da seqüência alvo é dependente da conformação do RNA regulatório, e a conformação do RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do aptâmero de RNA. Tais combinações de um aptâmero com um domínio de RNA regulatório são comumente conhecidas como "riboswitches". O RNA regulatório está tipicamente à jusante do aptâmero, mas dos dois domínios podem se sobrepor; vide, por exemplo, Najafi-Shoushtari & Famulok (2005) *RNA*, 11:1514-1520, que descreve uma ribozima em forma de grampo que inclui um domínio de aptâmero e é regulada competitivamente por flavina mononucleotídeo e um oligonucleotídeo complementar ao domínio do aptâmero. Em algumas modalidades, o RNA regulatório é operativamente ligado à seqüência alvo, e age "*in cis*". Em outras modalidades, o RNA regulatório não é operativamente ligado a seqüência alvo e age "*in trans*".

Qualquer seqüência alvo pode ser escolhida, incluindo uma ou mais seqüências alvo selecionadas a partir de um gene nativo à planta transgênica da invenção, um transgene na planta transgênica, e um gene nativo a uma praga ou patógeno da planta transgênica. A seqüência alvo pode incluir uma seqüência que expressa um gene de interesse (por exemplo, um RNA que codifica uma proteína), ou uma seqüência que suprime um

gene de interesse (por exemplo, um RNA que é processado para um siRNA ou miRNA que por sua vez suprime o gene de interesse). A sequência alvo pode ser sequência capaz de ser traduzida (codificante), ou pode ser sequência não codificante (tal como sequência regulatória não codificante), ou ambas. A sequência alvo pode incluir pelo menos uma sequência alvo eucariótica, pelo menos uma sequência alvo não-eucariótica, ou ambas. Uma sequência alvo pode incluir qualquer sequência de qualquer espécie (incluindo, mas não limitado a, não-eucariotos, tais como bactérias e vírus; fungos, plantas; incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como plantas de cultivo, plantas ornamentais, e plantas não-domesticadas ou selvagens; invertebrados tais como artrópodes, anelídeos, nematódeos, e moluscos; e vertebrados tais como anfíbios, peixe, aves, mamíferos domésticos ou selvagens e até mesmo humanos. Sequências alvo adequadas são ainda descritas como "genes alvo" sob o título "Genes Alvo".

Em modalidades de riboswitch que incluem um aptâmero e um RNA regulatório, o riboswitch regula a expressão da sequência alvo por qualquer mecanismo adequado. Um mecanismo não limitante é a regulação transcricional pela formação dependente de ligante de um tronco terminador intrínseco (uma estrutura "stem-loop" estendida tipicamente seguida por uma série de 6 ou mais resíduos de U) que faz com que a RNA polimerase aborte a transcrição, por exemplo, antes do RNAm completo ser formado. Em riboswitches "desligados", na ausência de ligante suficiente, o domínio do aptâmero não ligado permite a formação de um "tronco antiterminador", que impede a formação do tronco terminador intrínseco e assim permite que a transcrição ocorra; dessa forma, o estado padrão do riboswitch é "ligado" (isto é, a transcrição ocorre normalmente) e o ligante deve ser adicionado a desligar o riboswitch. Em riboswitches "ligados" que usam esse mecanismo, o domínio do aptâmero deve estar na conformação ligada (ligante ocupado) para permitir a formação do "tronco antiterminador" e permitir a transcrição. Outro mecanismo é a regulação da tradução, onde a ligação do ligante causa alterações estruturais em mRNAs de extensão completa e assim permite (ou impede) que os ribossomos se liguem ao sítio de ligação ribossomal (RBS); a formação de um tronco "anti-anti-RBS" e um tronco "anti-RBS"

também é mutuamente exclusivo. Em riboswitches "ligados" que usam esse mecanismo, a ausência do ligante permite a formação de um anti-anti-RBS, e assim um RBS estruturalmente desimpedido ao qual o ribossomo pode se ligar. Uma combinação da regulação transcricional e traducional também é possível. Para uma discussão detalhada de mecanismos de regulação, vide Mandal & Breaker (2004) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:451-463.

Em algumas modalidades, o RNA regulatório inclui uma ribozima, por exemplo, uma ribozima de autoclivagem, uma ribozima em forma de cabeça de martelo, ou uma ribozima em forma de grampo. Certas modalidades do RNA regulatório incluem seqüência de RNA que é complementar ou substancialmente complementar à seqüência alvo. Um exemplo não limitante é onde o RNA regulatório inclui um segmento anti-sentido que é complementar ou substancialmente complementar à seqüência alvo. Vide, por exemplo, Bayer & Smolke (2005) *Nature Biotechnol.*, 23:337-343, onde o RNA regulatório inclui tanto segmento anti-sentido complementar à seqüência alvo, como um segmento sentido complementar ao segmento anti-sentido, em que o segmento anti-sentido e o segmento sentido são capazes de hibridizar um ao outro para formar um RNA duplo filamento intramolecular.

Em algumas modalidades, a regulação de uma seqüência alvo envolve pareamento de base de Watson-Crick do RNA regulatório à seqüência alvo (por exemplo, em modalidade *transatuantes* vide, por exemplo, Bayer & Smolke (2005) *Nature Biotechnol.*, 23:337-343). Particularmente no caso de tais modalidades *transatuantes*, seqüências alvo adequadas incluem os genes alvo descritos sob o título "Genes Alvo". Uma seqüência alvo de interesse pode ser atingida mais especificamente por desenhar o RNA regulatório para incluir regiões substancialmente não idênticas a uma seqüência não alvo. Seqüências não-alvo podem incluir qualquer gene para o qual a expressão preferivelmente não é modificada, tanto em uma planta que transcreve o constructo de DNA recombinante como em organismos que podem entrar em contato com o RNA transcrito a partir do constructo de DNA recombinante. Uma seqüência não-alvo pode incluir qualquer seqüência de qualquer espécie (incluindo, mas não limitado a, não-eucariotos tais como bactérias, e vírus; fungos, plantas; incluindo monocotiledôneas e dico-

tiledôneas, tais como plantas de cultivo, plantas ornamentais, e plantas não-domesticadas ou selvagens; invertebrados tais como artrópodes, anelídeos, nematódeos, e moluscos; e vertebrados tais como anfíbios, peixes, aves, mamíferos domésticos ou selvagens, ou até mesmo seres humanos).

- 5 Uma modalidade fornece uma planta transgênica que tem no seu genoma um constructo de DNA recombinante que inclui DNA capaz de ser transcrito que inclui DNA que transcreve RNA capaz de se ligar a um ligante, em que o constructo confere macho esterilidade ou fertilidade induzível ou supressível quimicamente para hibridização. Exemplos preferidos
- 10 usam um riboswitch que contém um aptâmero que se liga a um ligante que é uma substância já registrada, por exemplo, um herbicida aprovado. Em um exemplo não limitante, uma planta transgênica que carrega um gene de macho esterilidade sob o controle de um promotor macho-específico e um riboswitch "desligado" de glifosato é macho estéril a menos que seja aplicado
- 15 glifosato. Ao contrário, uma planta transgênica que carrega um gene de macho esterilidade sob o controle de um promotor macho-específico e um riboswitch "ligado" de glifosato é macho estéril apenas quando glifosato é aplicado.

- Uma aplicação da invenção é fornecer um sistema resistente a
- 20 herbicida, ativado por ligante para preservação de identidade gênica ("bloqueio gênico") assim como para manter controle voluntário resistente a herbicida. Em uma modalidade, a sequência de DNA que codifica um riboswitch "ligado" é inserida em um cassete de expressão que contém como a sequência alvo "CP4", um marcador selecionável que confere resistência ao
- 25 glifosato, *epsps-cp4* (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*), para expressar condicionalmente CP4 em plantas transgênicas. Plantas transgênicas que carregam o cassete de expressão de CP4 controlado por riboswitch expressam CP4 apenas na presença do ligante, que é aplicado (por exemplo, por uma pulverização foliar) à
- 30 planta por meio de uma formulação de glifosato específica que contém o ligante. Ao ser aplicado, o herbicida de glifosato formulado ativa a transcrição/tradução de CP4 e torna a planta transgênica resistente ao glifosato. Plantas transgênicas são suscetíveis a formulações de glifosato genéricas

que não contêm o ligante. Da mesma forma, essa abordagem pode ser aplicada a qualquer outra combinação de gene de resistência a herbicida/herbicida, por exemplo, combinações de oxigenase que degrada dicamba/dicamba, ou gene de resistência a antibiótico/antibiótico.

5 Em outra modalidade, a sequência alvo é um gene endógeno a uma dada espécie, tal como uma dada planta (tal como, mas não limitado a, plantas agricolamente ou comercialmente importantes, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas) e a sequência não-alvo pode ser, por exemplo, um gene de uma espécie não-alvo, tal como outra espécie de planta ou um gene
10 de um vírus, fungo, bactéria, invertebrado, ou vertebrado ou até mesmo um ser humano. Um exemplo não limitante é onde é desejável desenhar o aptâmero, ou o RNA regulatório, ou ambos, a fim de modificar a expressão de uma sequência alvo que é endógena do gene para uma única espécie (por exemplo, lagarta da raiz do milho Ocidental, *Diabrotica virgifera virgifera* Le-
15 Conte) mas não modificar a expressão de uma sequência não-alvo tais como genes de espécies relacionadas, até mesmo intimamente relacionadas (por exemplo, lagarta da raiz do Norte, *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence, ou lagarta da raiz do milho do Sul, *Diabrotica undecimpunctata*).

 Em outras modalidades (por exemplo, onde é desejável modificar
20 car a expressão de uma sequência alvo entre várias espécies), pode ser desejável desenhar o aptâmero, ou o RNA regulatório ou ambos, para modificar a expressão de uma sequência alvo comum às múltiplas espécies nas quais a expressão da sequência alvo deve ser modificada. Dessa forma, o aptâmero, ou o RNA regulatório, ou ambos, pode ser selecionado para ser
25 específico para um táxon (por exemplo, específico para um gênero, família, ou até mesmo um táxon maior tal como um filo, por exemplo, artrópodes), mas não para outros táxons (por exemplo, plantas ou vertebrados ou mamíferos). Em um exemplo não limitante dessa modalidade, um RNA regulatório pode ser selecionado a fim de atingir fungos patogênicos (por exemplo, um
30 *Fusarium* spp.), mas não atingir qualquer sequência gênica de fungos benéficos (por exemplo, fungos benéficos de micorrizas do solo).

 Em outro exemplo não limitante dessa modalidade, o aptâmero, ou o RNA regulatório, ou ambos, para regular a expressão em lagarta de raiz

do milho podem ser selecionados para ser específicos para todos os membros do gênero *Diabrotica*. Por exemplo, um RNA regulatório que inclui um elemento de supressão gênica direcionado para *Diabrotica* (por exemplo, RNA anti-sentido, RNA duplo filamento, microRNA, ou repetições de RNA em tandem) podem ser selecionadas a fim de atingir qualquer seqüência de gene de coleópteros benéficos (por exemplo, besouros coccinelídeos benéficos, comumente conhecidos como joaninhas) ou outras espécies de insetos benéficos.

O grau necessário de especificidade de um RNA regulatório que inclui um elemento de supressão gênica (por exemplo, RNA anti-sentido, RNA duplo filamento, microRNA, ou repetições de RNA em tandem) para supressão de uma seqüência alvo depende de vários fatores. Por exemplo, onde o elemento de supressão gênica inclui RNA duplo filamento (dsRNA), fatores podem incluir o tamanho dos menores fragmentos de dsRNA que se espera que sejam produzidos pela ação de Dicer, e a importância relativa de diminuir o potencial de dsRNA's suprimirem as seqüências não-alvo. Por exemplo, onde os fragmentos de dsRNA são esperados ter 21 pares de base de tamanho, uma modalidade particularmente preferida pode ser incluir no RNA regulatório, uma seqüência capaz de formar dsRNA e codificar regiões substancialmente não-idênticas a uma seqüência não-alvo, tal como regiões dentro das quais cada fragmento contíguo que inclui pelo menos pareamentos de 21 nucleotídeos de menos do que 21 (por exemplo, de menos do que 21, ou de menos do que 20, ou de menos do que 19, ou de menos do que 17) dos 21 nucleotídeos contíguos de uma seqüência não-alvo. Em outra modalidade, regiões substancialmente não-idênticas a uma seqüência não-alvo incluem regiões dentro das quais cada fragmento contíguo que inclui pelo menos pareamentos de 19 nucleotídeos de menos que 19 (por exemplo, menos do que 19, ou menos do que 18, ou menos do que 17, ou menos do que 16) dos 19 nucleotídeos contíguos de uma seqüência não-alvo.

Em algumas modalidades, pode ser desejável desenhar o aptâmero, o RNA regulatório, ou ambos, para incluir regiões previstas para não gerar polipeptídeos indesejáveis, por exemplo, por rastrear o aptâmero, o

RNA regulatório, ou ambos, quanto a seqüências que podem codificar polipeptídeos indesejáveis conhecidos ou homólogos próximos desses. Polipeptídeos indesejáveis incluem, mas não são limitados a, polipeptídeos homólogos a polipeptídeos alergênicos conhecidos e polipeptídeos homólogos a toxinas polipeptídicas conhecidas. Seqüências disponíveis publicamente que codificam tais peptídeos potencialmente alergênicos estão disponíveis, por exemplo, a base de dados de alérgeno do Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) (disponível em allergenonline.com) ou as bases de dados Biotechnology Information for Food Safety Databases (disponíveis em www.iit.edu/~sgendel/fa.htm) (vide também, por exemplo, Gendel (1998) *Adv. Food Nutr. Res.*, 42:63-92). Seqüências indesejáveis também podem incluir, por exemplo, aquelas seqüências de polipeptídeo apontadas como toxinas conhecidas ou como alérgenos potenciais ou conhecidos e contidas em bases de dados publicamente disponíveis tais como GenBank, EMBL, SwissProt, e outras, que são pesquisáveis pelo sistema Entrez (www.ncbi.nih.gov/Entrez). Exemplos não limitantes de seqüências de peptídeos potencialmente alergênicos incluem glicinina de soja, oleosina e aglutinina de amendoim, gluteninas de trigo, caseína, lactalbumina, e lactoglobulina de leite bovino e tropomiosina de vários moluscos (allergenonline.com). Exemplos não limitantes de peptídeos potencialmente tóxicos indesejáveis incluem toxina tetânica tetA de *Clostridium tetani*, toxinas diarréicas de *Staphylococcus aureus*, e venenos tais como conotoxinas de *Conus* spp. e neurotoxinas de artrópodes e répteis (www.ncbi.nih.gov/Entrez).

Em um exemplo não limitante, um aptâmero proposto, RNA regulatório, ou ambos, pode ser rastreado para eliminar aquelas seqüências capazes de ser transcritas que codificam polipeptídeos com homologia perfeita a um alérgeno ou toxina conhecida por 8 aminoácidos contíguos, ou com pelo menos 35% de identidade por pelo menos 80 aminoácidos; tais rastreamentos podem ser realizados em qualquer e todas as possíveis fases de leitura em ambas as direções, em fases abertas de leitura potenciais que começam com ATG, ou em todas as possíveis fases abertas de leitura, independente de ser elas começam com um ATG ou não. Quando um "acerto" ou pareamento é feito, isto é, quando uma seqüência que codifica um poli-

peptídeo potencial com homologia perfeita a um alérgeno ou toxina conhecida por 8 aminoácidos consecutivos (ou pelo menos cerca de 35% de identidade por pelo menos cerca de 80 aminoácidos), é identificado, as seqüências de ácido nucléico que correspondem ao acerto podem ser evitadas, eliminadas, ou modificadas ao selecionar seqüências a ser usadas em um RNA para silenciar um gene alvo.

Evitar, eliminar, ou modificar uma seqüência indesejada pode ser obtido por qualquer um de vários métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Em alguns casos, o resultado pode ser novas seqüências que são acreditadas não existirem naturalmente. Por exemplo, evitar certas seqüências pode ser obtido por unir seqüências "limpas" em novas seqüências quiméricas para ser usadas em elemento de supressão gênica.

Onde o RNA regulatório inclui RNA duplo filamento (dsRNA) para silenciar um gene alvo, os requerentes reconhecem que em algum silenciamento mediado por dsRNA, é possível que seqüências de dsRNA que não pareiam perfeitamente sejam eficazes no silenciamento gênico. Por exemplo, foi mostrado que não pareamentos próximo ao centro de um sítio complementar de miRNA tem efeitos mais fortes sobre o silenciamento gênico do miRNA do que pareamentos localizados mais distalmente. Vide, por exemplo, Figura 4 em Mallory *et al.* (2004) *EMBO J.*, 23:3356-3364. Em outro exemplo, foi relatado que, tanto a posição de um par de base não pareado quanto a identidade dos nucleotídeos que formam o não pareamento influenciam a habilidade de um dado siRNA silenciar uma seqüência alvo, e que não pareamentos adenina-citosina, além do par de base oscilante G:U, foram bem-tolerados (vide Du *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:1671-1677). Dessa forma, um dsRNA regulatório que inclui RNA duplo filamento não precisa sempre ter 100% de identidade de seqüência com a seqüência alvo pretendida, mas geralmente teria preferivelmente identidade de seqüência substancial com a seqüência alvo pretendida, tal como cerca de 95%, cerca de 90%, cerca de 85%, ou cerca de 80% de identidade de seqüência com a seqüência alvo pretendida. Um versado na técnica seria capaz de julgar a importância dada ao rastreamento por regiões previstas para ser mais altamente específicas à primeira seqüência alvo ou previstas para

não gerar polipeptídeos indesejáveis, em relação à importância dada a outros critérios, tais como, mas não limitados a, porcentagem de identidade de sequência com a primeira sequência alvo pretendida ou a eficiência de silenciamento gênico prevista de uma dada sequência. Por exemplo, pode ser
 5 desejável para um dado RNA regulatório que inclui RNA duplo filamento para silenciamento gênico ser ativo entre várias espécies e, portanto um versado na técnica pode determinar que é mais importante incluir no RNA regulatório regiões específicas para as várias espécies de interesse, mas menos importante rastrear por regiões previstas para ter maior eficiência de silenciamento gênico ou para regiões previstas para gerar polipeptídeos indesejáveis.
 10

Em muitas modalidades, a célula de planta transgênica tem no seu genoma DNA recombinante que inclui DNA capaz de ser transcrito que inclui: (a) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um
 15 ligante, e (b) DNA que transcreve RNA regulatório capaz de regular a expressão de uma sequência alvo, em que a regulação é dependente da conformação do RNA regulatório, e a conformação do dito RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do dito aptâmero de RNA. Nessas modalidades, ligação do aptâmero ao seu ligante resulta em uma
 20 alteração específica na expressão da sequência alvo, que pode ser um aumento ou uma diminuição na expressão, dependendo do desenho do DNA recombinante.

Em uma modalidade, a ligação do ligante o aptâmero de RNA resulta em um aumento da expressão da sequência alvo em relação à expressão na ausência da ligação. Em outra modalidade, a ligação do ligante
 25 ao aptâmero de RNA resulta em uma diminuição da expressão da sequência alvo em relação à expressão na ausência da ligação.

Algumas modalidades são caracterizadas por "auto-inducibilidade". Em tal modalidade, a ligação do ligante ao aptâmero de RNA resulta em um aumento de expressão da sequência alvo em relação à expressão
 30 na ausência da ligação, em que o aumento de expressão resulta em um nível do ligante suficiente para manter o aumento de expressão. Em outra modalidade, a ligação do ligante ao aptâmero de RNA resulta em uma diminuição

ção de expressão da sequência alvo em relação a expressão na ausência da ligação, a diminuição da expressão resultando em um nível de ligante suficiente para manter o aumento de expressão.

Dessa forma, outro aspecto da invenção é um método de modificar a expressão de um gene de interesse em uma célula de planta, que inclui transcrever em uma célula de planta transgênica da invenção, ou uma planta, planta de progênie, ou semente ou outro tecido de planta derivado de tal célula de planta transgênica, DNA recombinante ou heterólogo capaz de regular a expressão de uma sequência alvo, em que a regulação é dependente da conformação do RNA regulatório, e em que a conformação do RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do aptâmero de RNA, pelo qual a expressão do gene de interesse é modificada em relação a sua expressão na ausência de transcrição do constructo de DNA recombinante.

Íntrons: como usado aqui, "íntron" ou "sequência de íntron" geralmente significa sequência de DNA não-codificante de um gene natural, que mantém nos constructos de DNA recombinantes dessa invenção, sua capacidade nativa de serem retirados de transcritos de pré-mRNA, por exemplo, sequências de íntron nativas encontradas associadas com regiões de RNA que codificam proteína, em que os íntrons nativos sofrem entrançamento, permitindo que éxons sejam agrupados em mRNAs maduros antes do RNA deixar o núcleo. Tal íntron retirável tem um sítio de splice 5' e um sítio de splice 3'. Íntrons podem sofrer "auto-entrançamento" ou não sofrer "auto-entrançamento" (isto é, que requer enzimas ou um spliceossomo para que o entrançamento ocorra) e podem ser selecionados quanto a diferente eficiência de entrançamento.

Íntrons adequados para uso em constructos da invenção podem ser íntrons virais (por exemplo, Yamada *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22:2532-2537), íntrons eucarióticos (incluindo íntrons de animais, de fungos e de plantas), íntrons arqueanos ou bacterianos (por exemplo, Belfort *et al.* (1995) *J. Bacteriol.*, 177:3897-3903), ou qualquer sequência de DNA de ocorrência natural ou artificial (por exemplo, Yoshimatsu & Nagawa (1989) *Science*, 244:1346-1348) com funcionalidade semelhante a íntron na planta

na qual o constructo de DNA recombinante da invenção deve ser transcrito. Embora essencialmente qualquer íntron possa ser usado na prática dessa invenção como um hospedeiro para DNA inserido, particularmente preferidos são íntrons que aumentam a expressão em uma planta ou íntrons que são

5 derivados de uma sequência líder 5' não traduzida. Quando um constructo de DNA recombinante da invenção é usado para transformar uma planta, íntrons originados na planta podem ser especialmente preferidos. Exemplos de íntrons de planta especialmente preferidos incluem um íntron de actina 1 de arroz (I-Os-Act1) (Wang *et al.* (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12:3399-3406; McEl-

10 roy *et al.* (1990) *Plant Cell*, 2:163-171), um íntron de proteína do choque térmico de milho (I-Zm-hsp70) (Patentes U.S. 5.593.874 e 5.859.347), e um íntron de álcool desidrogenase de milho (I-Zm-adh1) (Callis *et al.* (1987) *Genes Dev.*, 1:1183-1200). Outros exemplos de íntrons adequados para uso na invenção incluem a sequência líder 5' do vírus do mosaico do tabaco ou líder

15 "omega" (Gallie & Walbot (1992) *Nucleic Acids Res.*, 20:4631-4638), o íntron Shrunken-1 (Sh-1) (Vasil *et al.* (1989) *Plant Physiol.*, 91:1575-1579), o íntron de sacarose sintase de milho (Clancy & Hannah (2002) *Plant Physiol.*, 130:918-929), o íntron da proteína de choque térmico 18 (hsp18) (Silva *et al.* (1987) *J. Cell Biol.*, 105:245), e o íntron da proteína de choque térmico de 82

20 kilodaltons (hsp82) (Semrau *et al.* (1989) *J. Cell Biol.*, 109, p. 39A, e Mettler *et al.* (maio de 1990) N.A.T.O. Advanced Studies Institute on Molecular Biology, Elmer, Bavaria).

Elementos de expressão gênica: os constructos de DNA recombinantes podem ainda incluir um elemento de expressão gênica. Qualquer

25 gene ou genes de interesse podem ser expressos pelo elemento de expressão gênica, incluindo sequência codificante ou não codificante, ou ambas, e pode incluir sequências de ocorrência natural ou sequências artificiais ou quiméricas ou ambas. Quando o elemento de expressão gênica codifica uma proteína, tais constructos incluem preferivelmente um elemento terminador

30 funcional para permitir a transcrição e tradução do elemento de expressão gênica. Em modalidades que incluem plantas transgênicas indutivamente estéreis, o elemento de expressão gênica pode incluir, ou pode estar junto, ao RNA mensageiro que codifica uma proteína de tolerância a um herbicida.

Em modalidades em que o constructo de DNA recombinante contém um íntron, o constructo pode ainda incluir um elemento de expressão gênica para expressar pelo menos um gene de interesse, em que o elemento de expressão gênica está localizado adjacente ao íntron. Em outras modalidades, o constructo de DNA recombinante inclui um íntron no qual está inserido um gene de interesse, em que o elemento de expressão gênica também está localizado dentro do íntron; em tais casos, o elemento de expressão gênica pode ser operativamente ligado a um elemento terminador funcional que está ele próprio também dentro do íntron. O gene de interesse a ser expressão pelo elemento de expressão gênica pode incluir pelo menos um gene selecionado a partir do grupo que consiste em um gene alvo eucariótico, um gene alvo não-eucariótico, uma sequência de DNA precursora de microRNA. O gene de interesse pode incluir um único gene ou múltiplos genes (tais como múltiplas cópias de um único gene, múltiplos alelos de um único gene, ou múltiplos genes que incluem genes de múltiplas espécies). Em uma modalidade, o elemento de expressão gênica pode incluir sequências de peptídeo auto-hidrolizantes, por exemplo, localizadas entre múltiplas sequências codificantes para um ou mais polipeptídeos (vide, por exemplo, as sequências de autoclivagem 2A e "semelhante a 2A" de várias espécies, incluindo vírus, tripanossomas, e bactérias, descritas por Donnelly *et al.* (2001), *J. Gen. Virol.*, 82:1027-1041). Em outra modalidade, o elemento de expressão gênica pode incluir sequências de "salto" ribossomal, por exemplo, localizadas entre múltiplas sequências para um ou mais polipeptídeos (vide, por exemplo, as sequências de "salto" ribossomal 2A do aftovírus da doença aftosa (FMDV) descritas por Donnelly *et al.* (2001), *J. Gen. Virol.*, 82:1013-1025).

Um gene de interesse pode incluir qualquer sequência codificante ou não-codificante de qualquer espécie (incluindo, mas não limitado, não-eucariotos tais como bactérias e vírus; fungos; plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como planta de cultivo, plantas ornamentais, e plantas não domesticadas ou selvagens; invertebrados tais como artrópodes, anelídeos, nematódeos, e moluscos; e vertebrados tais como anfíbios, peixe, aves, e mamíferos. Exemplos não limitantes de uma sequência não-

codificante a ser expressa por um elemento de expressão gênica incluem, mas não limitados a, regiões 5' não traduzidas, promotores, intensificadores, ou outras regiões transcricionais não-codificantes, regiões 3' não-traduzidas, terminadores, íntron, microRNAs, seqüências de DNA precursoras de mi-

5 croRNA, pequenos RNAs de interferência, componentes de RNA de ribossomos ou ribozimas, pequenos RNAs nucleolares, e outros RNAs não codificantes. Exemplos não limitantes de um gene de interesse ainda incluem, mas não são limitados a, seqüência capaz de ser traduzida (codificante), tais como genes que codificam fatores de transcrição e genes que codificam en-

10 zimas envolvidas na biossíntese ou catabolismo de moléculas de interesse (tais como aminoácidos, ácidos graxos e outros lipídios, açúcares e outros carboidratos, polímeros biológicos, e metabólitos de origem biossintética mista). Um gene de interesse pode ser um gene nativo à planta na qual o constructo de DNA recombinante da invenção deve ser transcrito, ou pode

15 ser um gene não nativo. Um gene de interesse pode ser um gene marcador, por exemplo, um gene marcador selecionável que codifica um gene de resistência a antibiótico, antifúngico, ou herbicida ou um gene marcador que codifica uma característica facilmente detectável (por exemplo, fitoenossintase ou outros genes que conferem um pigmento particular à planta), ou um gene

20 que codifica uma molécula detectável, tal como uma proteína fluorescente, luciferase, ou um polipeptídeo único ou "sinalizador" de ácido nucléico detectável por métodos de detecção de proteína ou ácido nucléico, respectivamente). Marcadores selecionáveis são genes de interesse de utilidade particular em identificar processamento bem sucedido de constructos da inven-

25 ção.

Em algumas modalidades da invenção, os constructos de DNA recombinante são desenhados para suprimir pelo menos um gene endógeno ou exógeno e para expressar simultaneamente pelo menos um gene exógeno. Em um exemplo não limitante, o constructo de DNA recombinante inclui

30 um elemento de supressão gênica para suprimir um gene de lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (*LKR/SDH*) (de milho) endógeno, um elemento de expressão gênica para expressar uma proteína ácido diidrodipicolínico sintase (bacteriana) exógena, e um DNA que transcreve RNA

que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente em tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica epsps-CP4, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão de epsps-CP4 no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação de glifosato à planta. Tal constructo seria especialmente útil para fornecer milho com níveis aumentados de lisina e tolerância geral de glifosato, em que a esterilidade do milho é induzível pela aplicação de glifosato no(s) momento(s) do desenvolvimento apropriado(s). Em outro exemplo não limitante, o constructo de DNA recombinante inclui um elemento de supressão gênica para suprimir um gene de lagarta de raiz do milho, e DNA que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente em tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica epsps-CP4, em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão de epsps-CP4 no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação de glifosato à planta. Tal constructo seria especialmente útil para fornecer milho com resistência à lagarta da raiz de milho e tolerância geral de glifosato em que a esterilidade do milho é induzível pela aplicação de glifosato no(s) momento(s) do desenvolvimento apropriado(s).

Bordas de T-DNA: as bordas de T-DNA referem-se às seqüências de DNA ou regiões de DNA que definem o início e o final de um T-DNA de *Agrobacterium* T-DNA (DNA de tumor) e funcionam *in cis* para transferência de T-DNA no genoma de uma planta por transformação mediada por *Agrobacterium* (vide, por exemplo, Hooykaas & Schilperoort (1992) *Plant Mol. Biol.*, 19:15-38). Várias modalidades incluem constructo de DNA recombinante sem bordas de T-DNA, uma única borda de T-DNA, ou mais do que uma borda de T-DNA. Por exemplo, em modalidades onde o constructo de DNA recombinante inclui um íntron no qual um elemento de supressão gênica está inserido, o íntron está localizado preferivelmente entre um par de bordas de T-DNA, que podem ser um grupo de bordas de T-DNA esquerda e direita, um grupo de duas bordas de T-DNA esquerdas, ou um grupo de du-

as bordas de T-DNA direitas. Em outra modalidade, o constructo de DNA recombinante inclui uma única borda de T-DNA, um elemento de supressão gênica inserido em íntron, e pelo menos um elemento de expressão gênica.

Terminadores: muitas modalidades, particularmente onde o

5 constructo de DNA recombinante é projetado para ser transcrito em RNA mensageiro, incluem tanto um elemento promotor quanto um elemento terminador funcional que inclui um sinal de poliadenilação funcional e um sítio de poliadenilação, permitindo que o RNA transcrito a partir do constructo de DNA recombinante seja poliadenilado e processado para transporte para

10 dentro do citoplasma.

Em modalidades gerais como descritas sob o título "Constructos de DNA Recombinantes que Incluem Sítios de Reconhecimento de MicroRNA", um elemento terminador funcional pode estar presente ou ausente. Em modalidades onde um elemento terminador funcional está ausente, pelo me-

15 nos um de um sinal de poliadenilação funcional e um sítio de poliadenilação funcional está ausente. Em outras modalidades, uma região 3' não traduzida está ausente. Nesses casos, o constructo de DNA recombinante é transcrito como RNA não-poliadenilado e preferivelmente não é transportado para dentro do citoplasma.

20 DNA espaçador: segmentos de DNA espaçador podem incluir virtualmente qualquer DNA (tal como, mas não limitado a, seqüência de DNA capaz de ser transcrita que codifica um gene de interesse, seqüência de DNA capaz de ser transcrita que codifica um gene marcador ou repórter; DNA capaz de ser transcrito derivado de um íntron, que na transcrição pode

25 ser retirado do RNA transcrito resultante; DNA capaz de ser transcrito que codifica RNA que forma uma estrutura tal como uma alça ou "stem" ou um aptâmero capaz de se ligar a um ligante específico; DNA que pode sofrer entrançamento tais como íntrons e ribozimas que sofrem "auto-entrançamento"; DNA capaz de ser transcrito que codifica uma seqüência para detecção por hibridização de ácido nucléico, amplificação, ou seqüenciamento;

30 e uma combinação desses). DNA espaçador pode ser encontrado, por exemplo, adjacente a um elemento de expressão gênica. Em algumas modalidades, o DNA espaçador é em si seqüência sentido ou anti-sentido do gene

alvo. Em algumas modalidades preferidas, o RNA transcrito a partir do DNA espaçador (por exemplo, uma grande alça de sequência anti-sentido do gene alvo ou um aptâmero) assume uma estrutura secundária ou configuração tridimensional que confere ao transcrito uma característica desejada, tal como estabilidade aumentada, meia-vida *in vivo* aumentada, ou especificidade de célula ou tecido.

Fazendo e Usando Constructos de DNA Recombinante

Os constructos de DNA recombinante da presente invenção podem ser feitos por qualquer método adequado para a aplicação pretendida, levando em consideração, por exemplo, o tipo de expressão desejada e a conveniência de uso na planta na qual o constructo deve ser transcrito. Métodos comuns para fazer e usar constructos de DNA e vetores são bem-conhecidos na técnica e descritos em detalhes, por exemplo, em compêndios e manuais de laboratório incluindo Sambrook & Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (terceira edição), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. Um exemplo de tecnologia útil para construção de constructos de DNA e vetores para transformação está descrito na Publicação de Pedido de Patente US 2004/0115642 A1. Constructos de DNA também podem ser construídos usando a tecnologia de clonagem GATEWAY™ (disponibilizada por Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), que usa a reação de clonagem de recombinase LR sítio-específica do sistema Integrase/*att* da construção do vetor de bacteriófago lambda, ao invés de endonucleases de restrição e ligases. A reação de clonagem LR está descrita nas Patentes U.S. 5.888.732 e 6.277.608 e nas Publicações de Pedido de Patente U.S. 2001/283529, 2001/282319 e 2002/0007051. O Manual de Instruções da Tecnologia de Clonagem GATEWAY™, que também é fornecido pela Invitrogen, fornece instruções resumidas para clonagem de rotina de qualquer DNA desejado em um vetor que compreende elementos de expressão em planta operáveis. Outro método alternativo de fabricação de vetor emprega a clonagem independente de ligação como descrita por Aslandis *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:6069-6074 e Rashtchian *et al.* (1992) *Biochem.*, 206:91-97, onde um fragmento de DNA com terminações 5' e 3' de filamento simples é ligado a um vetor desejado que pode então ser amplificado *in vivo*.

Em certas modalidades, a seqüência de DNA do constructo de DNA recombinante inclui uma seqüência que teve otimização de códon para a planta na qual o constructo de DNA recombinante deve ser expresso. Por exemplo, um constructo de DNA recombinante a ser expresso em uma planta pode ter toda ou parte de sua seqüência (por exemplo, o primeiro elemento de supressão gênica ou o elemento de expressão gênica) com otimização de códon para expressão em uma planta por métodos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Patente U.S. 5.500.365 para uma descrição de otimização de códon para plantas; vide também De Amicis & Marchetti (2000) *Nucleic Acid Res.*, 28:3339-3346.

CÉLULAS DE PLANTA TRANSGÊNICAS E PLANTAS TRANSGÊNICAS

Um aspecto adicional dessa invenção fornece uma célula de planta transgênica que tem no seu genoma qualquer um dos constructos de DNA recombinante fornecidos por essa invenção. Ainda é fornecida uma planta transgênica que contém célula de planta transgênica dessa invenção. A planta transgênica da invenção inclui plantas em qualquer estágio de desenvolvimento e inclui uma planta regenerada preparada a partir de células transgênicas de planta aqui reivindicadas ou uma planta de progênie (que pode ser uma planta de progênie natural ou híbrida) da planta regenerada ou semente de tal planta transgênica. Também fornecida e reivindicada é uma semente transgênica que tem no seu genoma qualquer um dos constructos de DNA recombinante fornecidos por essa invenção.

Uma modalidade inclui uma planta transgênica que tem no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo da planta (ou seja, uma planta preparada a partir de célula de planta transgênica); e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida; em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo, e em que a esterilidade de uma planta transgênica preparada a partir da célula de planta transgênica é induzível pela aplicação do herbicida à planta.

A célula de planta transgênica pode ser uma célula de planta

isolada (por exemplo, células de planta individuais ou células cultivadas em ou sobre um meio de cultura artificial) ou pode ser uma célula de planta em tecido não diferenciado (por exemplo, calo ou qualquer agregado de células de planta). A célula de planta transgênica pode ser uma célula de planta em

5 pelo menos um tecido diferenciado selecionado a partir do grupo que consiste em folha (por exemplo, pecíolo e limbo), raiz, tronco (por exemplo, tubérculo, rizoma, estolho, bulbo e cormo), caule (por exemplo, xilema e floema), madeira, semente, fruto (por exemplo, noz, grão, frutas frescas) e flor (por exemplo, estame, filamento, antera, pólen, carpelo, pistilo, ovário, óvulos).

10 A célula de planta transgênica ou planta transgênica da invenção pode ser qualquer célula de planta ou planta de interesse. tanto as células de planta transitoriamente transformadas quanto as estavelmente transformadas são abrangidas por essa invenção. Plantas transgênicas estavelmente transformadas são particularmente preferidas. Em muitas modalidades

15 preferidas, a planta transgênica é uma planta transgênica fértil da qual a semente pode ser colhida e a invenção ainda reivindica semente transgênica de tais plantas transgênicas, em que a semente preferivelmente também contém o constructo recombinante dessa invenção.

Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas

20 Quando um constructo de DNA recombinante é usado para produzir uma célula de planta transgênica, planta transgênica ou semente transgênica dessa invenção, a transformação pode incluir qualquer um dos métodos e composições bem-conhecidos e demonstrados. Métodos adequados para transformação de planta incluem virtualmente qualquer método

25 pelo qual o DNA pode ser introduzido em uma célula, tal como por liberação direta de DNA (por exemplo, transformação de protoplastos mediada por PEG, por eletroporação, por agitação com fibras de carboneto de silicone, e por aceleração de partículas revestidas com DNA), por transformação mediada por *Agrobacterium*, por vetores virais e outros, etc. Um método preferido

30 de transformação de planta é o bombardeio com micro-projéteis, por exemplo, como ilustrado nas Patentes U.S. 5.015.580 (soja), 5.550.318 (milho), 5.538.880 (milho), 6.153.812 (trigo), 6.160.208 (milho), 6.288.312 (arroz) e 6.399.861 (milho) e 6.403.865 (milho).

Outro método preferido de transformação de planta é a transformação mediada por *Agrobacterium*. Em uma modalidade preferida da invenção, a célula de planta transgênica da invenção é obtida pela transformação por meio de *Agrobacterium* que contem um sistema de plasmídeo Ti binário, em que o *Agrobacterium* carrega um primeiro plasmídeo Ti e um segundo plasmídeo, quimérico que contém pelo menos uma borda de T-DNA de um plasmídeo Ti selvagem, um promotor funcional na célula de planta transformada e operativamente ligado a um constructo de supressão gênica da invenção. Vide, por exemplo, o sistema binário descrito na Patente U.S. 5.159.135. Vide também De Framond (1983) *Biotechnology*, 1:262-269; e Hoekema *et al.*, (1983) *Nature*, 303:179. Em tal sistema binário, o menor plasmídeo, contendo a borda ou bordas de T-DNA, pode ser convenientemente construído e manipulado em um hospedeiro alternativo adequado, tal como *E. coli*, e então transferido para *Agrobacterium*.

Procedimentos detalhados para transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*, especialmente plantas de cultivo, incluem, por exemplo, os procedimentos descritos nas Patentes U.S. 5.004.863, 5.159.135, e 5.518.908 (algodão); 5.416.011, 5.569.834, 5.824.877 e 6.384.301 (soja); 5.591.616 (milho); 5.981.840 (milho); 5.463.174 (brássicas). Métodos similares foram relatados para muitas espécies de planta, tanto dicotiledôneas como monocotiledôneas, incluindo, entre outras, amendoim (Cheng *et al.* (1996) *Plant Cell Rep.*, 15: 653); aspargo (Bytebier *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:5345); cevada (Wan & Lemaux (1994) *Plant Physiol.*, 104:37); arroz (Toriyama *et al.* (1988) *Bio/Technology*, 6:10; Zhang *et al.* (1988) *Plant Cell Rep.*, 7:379; trigo (Vasil *et al.* (1992) *Bio/Technology*, 10:667; Becker *et al.* (1994) *Plant J.*, 5:299), alfalfa (Masoud *et al.* (1996) *Transgen. Res.*, 5:313); e tomate (Sun *et al.* (2006) *Plant Cell Physiol.*, 47:426-431). Vide também a Publicação de Pedido de Patente U.S. 2003/0167537 A1 para uma descrição de vetores, métodos de transformação e produção de plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* onde os fatores de transcrição são expressos constitutivamente por um promotor de CaMV35S. Células de plantas transgênicas e plantas transgênicas também podem ser obtidas por transformação com outros vetores, tais como, mas

não limitados a vetores virais (por exemplo, potivírus "etch" do tabaco (TEV), vírus do mosaico estriado da cevada (BSMV) e os vírus referenciados em Edwardson & Christie, "The Potyvirus Group: Monograph No. 16, 1991, Agric. Exp. Station, Univ. da Flórida), plasmídeos, cosmídeos, YACs (cromossomos artificiais de levedura), BACs (cromossomos artificiais bacterianos) ou qualquer outro vetor de clonagem adequado, quando usado com um protocolo de transformação apropriado, por exemplo, infecção bacteriana (por exemplo, com *Agrobacterium* como descrito acima), constructos de cromossomo artificial bacteriano binário, liberação direta de DNA (por exemplo, através de transformação mediada por PEG, absorção de DNA mediada por dessecação/inibição, eletroporação, agitação com fibras de carboneto de silicone e bombardeio de microprojéteis). Ficará claro para o versado na técnica que várias metodologias de transformação podem ser usadas e modificadas para a produção de plantas transgênicas estáveis a partir de qualquer quantidade de espécies de plantas de interesse.

Métodos de transformação para fornecer células transgênicas de planta e plantas transgênicas contendo DNA recombinante estavelmente integrado são praticados preferivelmente em cultura de tecido em meio e em um ambiente controlado. "Meio" refere-se às várias misturas de nutrientes que são usadas para cultivar células *in vitro*, ou seja, fora do organismo vivo intacto. Células alvo receptoras incluem, mas não estão limitadas a células do meristema, calo, embriões imaturos ou partes de embriões, células de gametas tais como micrósporos, pólen, esperma e células de óvulos. Qualquer célula a partir da qual uma planta fértil pode ser regenerada é contemplada como célula receptora útil para a prática da invenção. Calo pode ser iniciado a partir de várias fontes de tecidos, incluindo, mas não limitado a embriões imaturos ou partes de embriões, meristemas apicais de plântulas, microsporos e semelhantes. Aquelas células que são capazes de proliferar como calo podem servir como células receptoras para transformação genética. Métodos práticos e materiais de transformação para produzir as plantas transgênicas dessa invenção (por exemplo, vários meios e células alvo receptoras, transformação de embriões imaturos e subsequente regeneração de plantas transgênicas férteis) estão descritos, por exemplo, nas Patentes

U.S. 6.194.636 e 6.232.526 e na Publicação de Pedido de Patente U.S. 2004/0216189.

Na prática da transformação comum, o DNA é introduzido apenas em uma pequena porcentagem das células alvo em qualquer experimento de transformação. Genes marcadores são geralmente usados para fornecer um sistema eficaz para identificação daquelas células que estão estavelmente transformadas por receber e integrar um constructo de DNA transgênico nos seus genomas. Genes marcadores preferidos fornecem marcadores seletivos que conferem resistência a um agente seletivo, tal como um antibiótico ou herbicida. Qualquer um dos antibióticos ou herbicidas aos quais uma célula de planta pode ser resistente pode ser um agente útil para seleção. Células potencialmente transformadas são expostas ao agente seletivo. Na população de células sobreviventes estarão aquelas células onde, geralmente, o gene que confere resistência está integrado e expresso em níveis suficientes para permitir a sobrevivência da célula.

As células podem ser testadas adicionalmente para confirmar a integração estável do DNA recombinante. Genes marcadores seletivos comumente usados incluem aqueles que conferem resistência a antibióticos tais como canamicina ou paromomicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) e gentamicina (*aac3* e *aacC4*) ou resistência a herbicidas tais como glifosinato (*bar* ou *pat*) e glifosato (EPSPS). Exemplos de genes marcadores seletivos úteis e agentes de seleção estão ilustrados nas Patentes U.S. 5.550.318, 5.633.435, 5.780.708 e 6.118.047. Marcadores ou repórteres rastreáveis, tais como marcadores que fornecem uma habilidade para identificar visualmente transformantes também podem ser empregados. Exemplos não limitantes de marcadores rastreáveis úteis incluem, por exemplo, um gene que expressa uma proteína que produz um cor detectável pela ação sobre um substrato cromogênico (por exemplo, *beta*-glicuronidase (GUS) (*uidA*) ou luciferase (*luc*) ou que é detectável por si mesmo, tal como a proteína verde fluorescente (GFP) (*gfp*) ou uma molécula imunogênica. Aqueles versados na técnica reconhecerão que muitos outros marcadores ou repórteres úteis estão disponíveis para uso.

A detecção ou medida da alteração resultante na expressão de

um gene alvo (ou expressão concomitante de um gene de interesse) obtida pela transcrição do constructo recombinante na planta transgênica da invenção pode ser obtida por quaisquer meios adequados, incluindo métodos de detecção de proteína (por exemplo, western blots, ELISAs e outros métodos imunoquímicos), medidas de atividade enzimática ou métodos de detecção de ácidos nucleicos (por exemplo, Southern blots, northern blots, PCR, RT-PCR, hibridização fluorescente *in situ*). Tais métodos são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica como evidenciado pelos vários manuais disponíveis; vide, por exemplo, Joseph Sambrook & David W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (terceira edição), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001; Frederick M. Ausubel *et al.* (editors) "Short Protocols in Molecular Biology" (quinta edição), John Wiley and Sons, 2002; John M. Walker (editor) "Protein Protocols Handbook" (segunda edição), Humana Press, 2002; e Leandro Peña (editor) "Transgenic Plants: Methods and Protocols", Humana Press, 2004.

Outros métodos adequados para detectar ou medir a alteração resultante na expressão de um gene alvo (ou expressão concomitante de um gene de interesse) obtida pela transcrição do DNA recombinante na planta transgênica da invenção incluem a medida de qualquer outra característica que seja uma indicação direta ou representativa de expressão do gene alvo (ou expressão concomitante de um gene de interesse) na planta transgênica na qual o DNA recombinante é transcrito, em relação a uma na qual o DNA recombinante não é transcrito, por exemplo, características morfológicas grosseiras ou microscópicas, taxas de crescimento, rendimento, taxas de reprodução ou de recrutamento, resistência a pragas ou patógenos, ou resistência a estresse biótico ou abiótico (por exemplo, estresse por falta de água, estresse por sal, estresse por nutrientes, estresse por calor ou frio). Tais métodos podem usar medidas diretas de uma característica fenotípica ou ensaios substitutos (por exemplo, em plantas, esses ensaios incluem ensaios de parte da planta tais como ensaios de folha ou raiz para determinar a tolerância ao estresse abiótico).

Os constructos de DNA recombinante da invenção podem ser adicionados com outro DNA recombinante para conferir características adi-

cionais (por exemplo, no caso de plantas transformadas, características incluem resistência a herbicida, resistência a praga, tolerância a germinação no frio, tolerância a falta de água e semelhantes), por exemplo, pela expressão ou supressão de outros genes. Constructos para a diminuição ou aumento coordenado de expressão gênica estão descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. 2004/0126845 A1.

Sementes de plantas transgênicas, férteis podem ser coletadas e usadas para cultivar de gerações de progênie, incluindo gerações híbridas, de plantas transgênicas dessa invenção que incluem o constructo de DNA recombinante nos seus genomas. Assim, além da transformação direta de uma planta com um constructo de DNA recombinante, plantas transgênicas da invenção podem ser preparadas pelo cruzamento de uma primeira planta que tem o DNA recombinante com uma segunda planta que não tem o constructo. Por exemplo, o DNA recombinante pode ser introduzido em uma linhagem de planta que é passível de transformação para produzir uma planta transgênica, que pode ser cruzada com uma segunda linhagem de planta para introduzir o DNA recombinante dentro da progênie resultante. Uma planta transgênica da invenção com um DNA recombinante (que efetua alteração de um gene alvo) pode ser cruzada com uma linhagem de planta que tem outro DNA recombinante que confere uma ou mais características adicionais (tais como, mas não limitadas a resistência a herbicida, resistência a praga ou doença, resistência a estresse ambiental, conteúdo de nutrientes modificado e melhoria no rendimento) para produzir plantas de progênie que têm o DNA recombinante que confere tanto o comportamento de expressão da sequência alvo desejada como a(s) característica(s) adicional (ais).

Tipicamente, em tal reprodução para combinar características a planta transgênica que doa a característica adicional é de linhagem masculina e a planta transgênica que carrega as características de base é de linhagem feminina. A progênie desse cruzamento se separa tal que algumas das plantas carregarão o DNA para ambas as características parentais e algumas carregarão o DNA para uma característica parenteral; tais plantas podem ser identificadas por marcadores associados com o DNA recombinante parental. Plantas de progênie que carregam o DNA para ambas as caracte-

rísticas parentais podem ser novamente cruzadas com a linhagem feminina parental múltiplas vezes, por exemplo, geralmente de 6 a 8 gerações, para produzir uma planta de progênie com substancialmente o mesmo genótipo que uma linhagem parental transgênica original mas com o DNA recombinante da outra linhagem parental transgênica.

Outro aspecto da invenção ainda é uma planta transgênica cultivada a partir da semente transgênica da invenção. Essa invenção contempla plantas transgênicas cultivadas diretamente a partir de semente transgênica que contem o DNA recombinante assim como gerações de progênie de plantas, incluindo linhagens de planta natural ou híbrida, feitas pelo cruzamento de uma planta transgênica cultivada diretamente a partir de semente transgênica com uma segunda planta não cultivada a partir da mesma semente transgênica.

O cruzamento pode incluir, por exemplo, as seguintes etapas:

- (a) sementes de planta da primeira planta parental (por exemplo, não-transgênica ou transgênica) e uma segunda planta parental que é transgênica de acordo com a invenção;
- (b) cultivo das sementes da primeira e segunda plantas parentais em plantas que têm flores;
- (c) polinizar uma flor a partir da primeira parental com pólen da segunda parental; e
- (d) coletar sementes produzidas na planta parental que tem a flor fertilizada.

Freqüentemente é desejável introduzir DNA recombinante em variedades de elite, por exemplo, por retrocruzamento, para transferir uma característica específica desejável de uma fonte para uma planta natural ou outra planta que não tem aquela característica. Isso pode ser obtido, por exemplo, por cruzar primeiro um organismo de cruzamento superior ("A") (parental recorrente) com um organismo de cruzamento doador ("B") (parental não recorrente), que carrega o(s) gene(s) apropriado(s) para a característica em questão, por exemplo, um constructo preparado de acordo com a presente invenção. A progênie desse cruzamento primeiro é selecionada na progênie resultante quanto a característica desejada a ser transferida para o

parente não recorrente "B" e então a progênie selecionada é cruzada de novo com o parente recorrente superior "A". Após cinco ou mais gerações de retrocruzamento com seleção para a característica desejada, a progênie é homozigota para os loci que controlam a característica que está sendo transferida, mas é semelhante ao parente superior na maioria ou em quase todos os outros genes. A última geração de retrocruzamento pode ser autofecundada para dar uma progênie que é de geração pura para o(s) gene(s) sendo transferido(s), isto é, um ou mais eventos de transformação.

Através de uma série de manipulações de reprodução, um constructo de DNA selecionado pode ser passado de uma linhagem para outra linhagem inteiramente diferente sem a necessidade de manipulação recombinante adicional. Pode-se produzir assim plantas naturais que são gerações verdadeiras para um ou mais constructos de DNA. Pelo cruzamento de plantas naturais diferentes, pode-se produzir um grande número de híbridos diferentes com diferentes combinações de constructos de DNA. Dessa maneira, podem ser produzidas plantas que têm as propriedades agronômicas desejáveis freqüentemente associadas com híbridos ("vigor híbrido"), assim como as características desejáveis transmitidas por um ou mais constructos de DNA.

Marcadores genéticos podem ser usados para auxiliar na introdução de um ou mais constructos de DNA da invenção de um antecedente genético para outro. A seleção auxiliada por marcador oferece vantagens em relação à reprodução convencional por que pode ser usada para evitar erros causados por variações fenotípicas. Além disso, marcadores genéticos podem fornecer dados em relação ao grau relativo de germoplasma de elite na progênie individual de um cruzamento em particular. Por exemplo, quando uma planta com uma característica desejada que de outra maneira tem um antecedente genético não agronomicamente desejável é cruzada com um parente de elite, marcadores genéticos podem ser usados para selecionar a progênie que possui não apenas a característica de interesse, mas também tem uma proporção relativamente grande do germoplasma desejado. Dessa maneira, o número de gerações necessárias para introduzir uma ou mais características em um antecedente genético em particular é minimizado. A

utilidade da seleção auxiliada por marcador em cruzamento de plantas transgênicas da presente invenção, assim como tipos de marcadores moleculares úteis, tais como, mas não limitados a SSRs e SNPs, está discutida na Publicação de Pedido PCT WO 02/062129 e nas Publicações Pedido de Patente U.S. Números 2002/0133852, 2003/0049612 e 2003/0005491.

Em certas células de plantas transgênicas e plantas transgênicas da invenção, pode ser desejável expressar (ou suprimir) concomitantemente um gene de interesse enquanto também se regula a expressão de um gene alvo. Assim, em algumas modalidades, a planta transgênica contém o DNA recombinante incluindo ainda um elemento de expressão (ou supressão) gênica para expressar pelo menos um gene de interesse, e regulação da expressão de gene alvo é preferivelmente efetuada com a expressão concomitante (ou supressão) de pelo menos um gene de interesse na planta transgênica.

Assim, como aqui descrito aqui, as células de planta transgênica ou plantas transgênicas da invenção podem ser obtidas pelo uso de qualquer método de transformação integrante ou não-integrante transitório ou estável apropriado, do conhecido na técnica ou descrito no momento. Os constructos de DNA recombinante podem ser transcritos em qualquer célula ou tecido de planta ou em uma planta completa de qualquer estágio de desenvolvimento. Plantas transgênicas podem ser derivadas de qualquer planta monocotiledônea ou dicotiledônea, tais como, mas não limitadas a plantas de interesse comercial ou agrícola, tais como plantas de cultivo (especialmente plantas de cultivo usadas para alimentação humana ou ração para animais), árvores que produzem madeira ou polpa, hortaliças, plantas frutíferas e plantas ornamentais. Exemplos não limitantes de plantas de interesse incluem plantas de culturas de grãos (tais como trigo, aveia, cevada, milho, centeio, triticale, arroz, painço, sorgo, quinoa, amaranto, trigo sarraceno); plantas de culturas de forragem (tais como grama forrageira e dicotiledôneas forrageiras incluindo alfafa, ervilhaca, trevo e semelhantes); cultura de plantas oleaginosas (tais como algodão, açafrão, girassol, soja, canola, colza, linhaça, amendoim e óleo de palma); árvores de nozes (tais como noz, caju, avelã, pecã, amêndoa e semelhantes); cana de açúcar, coco, tamareira, a-

5 zeitona, chá e café; árvores que produzem madeira e polpa; vegetais tais como legumes (por exemplo, feijões, ervilhas, lentilhas, alfafa, amendoim), alface, aspargo, alcachofra, aipo, cenoura, rábano, brássicas (por exemplo, repolho, couve de folhas, mostarda e outras brássicas folhosas, brócolis, couve-flor, couve de Bruxelas, nabo, couve-rábano), cucurbitáceas comestíveis (pepino, melões, abobrinha, abóbora), alhos comestíveis (por exemplo, cebolas, alho, alho-poró, chalotas, cebolinha), membros comestíveis das Solanaceae (por exemplo, tomates, berinjelas, batatas, pimentas, amora amarela) e membros comestíveis das Chenopodiaceae (por exemplo, beterraba, acelga, espinafre, quinoa, amaranto); plantas de cultura de frutas tais como maçãs, pêra, frutas cítricas (por exemplo, laranja, lima, limão, toranja e outras), frutas com caroço (por exemplo, abricó, pêssego, ameixa, nectarina), banana, abacaxi, uva, kiwi, papaia, abacate e cerejas; e plantas ornamentais incluindo plantas ornamentais com flores, árvores e arbustos ornamentais, coberturas de solo ornamentais e gramas ornamentais. As plantas dicotiledôneas preferidas incluem, mas não são limitadas a canola, algodão, batata, quinoa, amaranto, trigo sarraceno, açafrão, soja, beterraba e girassol, mais preferivelmente soja, canola e algodão. Monocotiledôneas preferidas incluem, mas não são limitadas a trigo, aveia, cevada, milho, centeio,
 10 triticale, arroz, gramas ornamentais e forrageiras, sorgo, painço e cana de açúcar, mais preferivelmente milho, trigo e arroz.

O objetivo principal na transformação de planta é produzir plantas que são úteis ao homem. Com relação a isso, as plantas transgênicas da invenção podem ser usadas virtualmente para qualquer propósito considerado de valor para o agricultor ou para o consumidor. Por exemplo, pode-se
 25 desejar colher a própria planta transgênica ou colher a semente transgênica da planta transgênica para propósitos de plantio ou podem ser feitos produtos a partir de plantas transgênicas ou suas sementes, tais como óleo, amido, etanol ou outros produtos de fermentação, ração animal ou alimento humano, fármacos e vários produtos industriais. Por exemplo, o milho é usado
 30 extensivamente na indústria alimentícia e de ração, assim como em aplicações industriais. Discussão adicional dos usos do milho pode ser encontrada, por exemplo, nas Patentes U.S. Números 6.194.636, 6.207.879,

6.232.526, 6.426.446, 6.429.357, 6.433.252, 6.437.217, e 6.583.338 e nas Publicações PCT WO 95/06128 e WO 02/057471. Assim, essa invenção também fornece produtos de consumo produzidos a partir de uma célula transgênica de planta, planta ou semente transgênicas dessa invenção, incluindo, mas não limitado a folhas, raízes, brotos, tubérculos, caules, frutos, sementes ou outras partes de uma planta, cereais, óleos, extratos, produtos de fermentação ou digestão, grãos triturados ou inteiros ou sementes de uma planta ou qualquer produto alimentício ou não alimentício incluindo tais produtos de consumo produzidos a partir de uma célula de planta, planta ou semente transgênica dessa invenção. A detecção de uma ou mais seqüências de ácidos nucléicos dos constructos de DNA recombinante dessa invenção em um ou mais produtos de consumo aqui contemplados é *de facto* evidência de que o produto de consumo contém ou é derivado de uma célula de planta, planta ou semente transgênica dessa invenção.

Em modalidades preferidas, a planta transgênica que tem no seu genoma um constructo de DNA recombinante dessa invenção tem pelo menos uma característica adicional alterada, em relação a uma planta que não tem o constructo de DNA recombinante, selecionada a partir do grupo de características que consiste em:

- (a) tolerância melhorada ao estresse abiótico;
- (b) tolerância melhorada ao estresse biótico;
- (c) composição de metabólito primário modificada;
- (d) composição de metabólito secundário modificada;
- (e) composição de elemento traço, carotenóide ou vitamina modificada;
- (f) rendimento melhorado;
- (g) habilidade melhorada em usar nitrogênio ou outros nutrientes;
- (h) características agronômicas modificadas;
- (i) crescimento ou características reprodutivas modificadas; e
- (j) colheita, armazenamento e qualidade de processamento melhorados.

Em modalidades particularmente preferidas, a planta transgênica

é caracterizada por: tolerância melhorada ao estresse abiótico (por exemplo, tolerância a falta de água ou estiagem, calor, frio, níveis não-ótimos de nutriente ou sal, níveis não-ótimos de luz) ou de estresse biótico (por exemplo, aglomeração, alelopatia ou lesão); por uma composição de metabólito primário modificada (por exemplo, ácido graxo, óleo, aminoácido, proteína, açúcar ou carboidrato); composição de metabólito secundário modificada (por exemplo, alcalóides, terpenóides, policetídeos, peptídeos não-ribossomais e metabólitos secundários de origem biossintética mista); composição de elemento traço (por exemplo, ferro, zinco), carotenóide (por exemplo, beta-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina ou outros carotenóides e xantofilos) ou vitamina (por exemplo, tocoferóis) modificada; rendimento melhorado (por exemplo, rendimento melhorado sob condições sem estresse ou rendimento melhorado sob estresse biótico ou abiótico); habilidade melhorada de usar nitrogênio ou outros nutrientes; características agronômicas modificadas (por exemplo, maturação retardada, envelhecimento retardado; maturidade precoce ou retardada; tolerância à sombra melhorada; resistência melhorada ao acondicionamento da raiz ou caule; resistência melhorada a "green snap" de caule; resposta modificada de fotoperíodo de luz); características de crescimento ou reprodutivas modificadas (por exemplo, nanismo intencional; esterilidade masculina intencional, útil em, por exemplo procedimentos de hibridização melhorados; taxa de crescimento vegetativo melhorada; germinação melhorada; fertilidade masculina ou feminina melhorada); colheita, armazenamento e qualidade de processamento melhorados (por exemplo, resistência melhorada a pragas durante armazenamento, resistência melhorada à quebra, atratividade melhorada para os consumidores); ou qualquer combinação dessas características.

Em uma modalidade preferida, semente transgênica ou semente produzida pela planta transgênica, tem a composição do metabólito primário modificada (por exemplo, ácido graxo, óleo, aminoácido, proteína, açúcar ou carboidrato), composição de metabólito secundário modificada (por exemplo, alcalóides, terpenóides, policetídeos, peptídeos não-ribossomais e metabólitos secundários de origem biossintética mista), composição de elemento traço (por exemplo, ferro, zinco), carotenóide (por exemplo, beta-caroteno, lico-

peno, luteína, zeaxantina ou outros carotenóides e xantofilos) ou vitamina (por exemplo, tocoferóis) modificada, colheita, armazenamento ou qualidade de processamento melhoradas ou uma combinação desses. Por exemplo, pode ser desejável modificar o aminoácido (por exemplo, lisina, metionina, triptofano ou proteína total), óleo (por exemplo, composição de ácido graxo ou óleo total), carboidrato (por exemplo, açúcares simples ou amidos), conteúdo de elemento traço, carotenóide ou vitamina de sementes de plantas cultiváveis (por exemplo, canola, algodão, açafrão, beterraba, girassol, trigo, milho ou arroz), preferivelmente em combinação com colheita de semente, armazenamento e qualidade de processamento melhorados e assim, fornecer sementes melhoradas para uso em rações animais e alimentos para humanos. Em outro exemplo, pode ser desejável alterar os níveis de componentes nativos da planta transgênica ou semente de planta transgênica, por exemplo, para diminuir os níveis de proteínas com baixos níveis de lisina, metionina ou triptofano ou para aumentar os níveis de um aminoácido ou ácido graxo desejados ou para diminuir os níveis de uma proteína ou glicoproteína alergênicas (por exemplo, alergenos do amendoim incluindo ara h 1, alergenos do trigo incluindo gliadinas e gluteninas, alergenos da soja incluindo o alergeno P34, globulinas, glicininas e conglicininas) ou de um metabólito tóxico (por exemplo, glicosídeos cianogênicos na mandioca, alcalóides de solanina em membros das Solanaceae).

EXEMPLOS

Exemplo 1

Este ilustra exemplos não limitantes de constructos de DNA recombinante para supressão de pelo menos um gene alvo; esses constructos, quando projetados para incluir um sítio de reconhecimento de miRNA, permitem a expressão do elemento de supressão gênica em tecidos específicos.

Figura 1A descreve esquematicamente exemplos não limitantes de constructos de DNA recombinante da invenção para supressão de pelo menos um gene alvo. Esses constructos incluem pelo menos um primeiro elemento de supressão gênica ("GSE" ou "GSE1") para suprimir pelo menos um primeiro gene alvo, em que o primeiro elemento de supressão gênica

está inserido em um íntron flanqueado em um ou ambos os lados por um DNA que não codifica proteína. Esses constructos utilizam um íntron (em muitas modalidades um íntron derivado de uma região 5' não traduzida ou um íntron que aumenta a expressão é preferido) para liberar um elemento de

5 supressão gênica sem necessitar da presença de quaisquer éxons que codifiquem proteína (seqüência codificante). Os constructos podem opcionalmente incluir pelo menos um segundo elemento de supressão gênica ("GSE2") para suprimir pelo menos um segundo gene alvo, pelo menos um elemento de expressão gênica ("GEE") para expressar pelo menos um gene

10 de interesse (que pode ser uma seqüência codificante ou não codificante ou ambas), ou ambos. Em modalidades que contêm um elemento de expressão gênica opcional, o elemento de expressão gênica pode estar localizado fora (por exemplo, adjacente a) do íntron. Em algumas modalidades, o íntron que contém o primeiro elemento de supressão gênica está a 3' de um termina-

15 dor.

Para diferenciar mais claramente constructos de DNA recombinante da invenção (que contêm pelo menos um elemento de supressão gênica inserido dentro de um único íntron flanqueado em um ou ambos os lados por um DNA não codificante de proteína) da técnica anterior, a **Figura**

20 **1B** descreve esquematicamente exemplos de constructos de DNA da técnica anterior. Esses constructos podem conter um elemento de supressão gênica que está localizado adjacente a um íntron flanqueado por uma seqüência codificante de proteína ou entre dois íntrons distintos (em que o elemento de supressão gênica não está inserido em nenhum dos dois íntrons distin-

25 tos) ou podem incluir um elemento de expressão gênica que inclui um elemento de supressão gênica inserido dentro de um íntron que está flanqueado por múltiplos éxons (por exemplo, éxons que incluem a seqüência codificante de uma proteína).

A **Figura 2** descreve vários exemplos não limitantes de elementos de supressão gênica e DNAs exógenos capazes de ser transcritos úteis nos constructos de DNA recombinante da invenção. Onde desenhados como um filamento simples (**Figuras 2A** até **2E**), esses são convencionalmente representados na direção transcricional 5' para 3' (esquerda para direita); as

30

setas indicam a sequência anti-sentido (a ponta da seta aponta para a esquerda), ou a sequência sentido (ponta da seta apontando para direita). Esses elementos de supressão gênica e DNAs exógenos capazes de ser transcritos podem incluir: DNA que inclui pelo menos um segmento de DNA

5 anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, ou DNA que inclui múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2A**); DNA que inclui

10 pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo, ou DNA que inclui múltiplas cópias de pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2B**); DNA que transcreve RNA

15 suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de RNA duplo filamento e inclui pelo menos um segmento de DNA anti-sentido que é anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um gene alvo e pelo menos um segmento de DNA sentido que é pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2C**); DNA que transcreve RNA para

20 suprimir o pelo menos um primeiro gene alvo pela formação de um RNA único duplo filamento e inclui múltiplos segmentos seriados de DNA anti-sentido que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA seriados sentido que são pelo menos um segmento de pelo menos um primeiro gene alvo (**Figura 2D**); DNA que transcreve RNA para suprimir pelo menos um primeiro gene alvo pela

25 formação de múltiplos filamentos duplas de RNA e inclui múltiplos segmentos de DNA anti-sentido que são anti-sentido a pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e múltiplos segmentos de DNA sentido que têm pelo menos um segmento do pelo menos um primeiro gene alvo e em que os ditos múltiplos segmentos de DNA anti-sentido e os múltiplos segmentos de DNA de sentido estão arranjados em uma série de repetições

30 invertidas (**Figura 2E**); e DNA que inclui nucleotídeos derivados de um miRNA ou DNA que inclui nucleotídeos de um siRNA (**Figura 2F**).

A **Figura 2F** representa vários arranjos não limitantes de RNA duplo filamento que podem ser transcritos a partir de modalidades dos ele-

mentos de supressão gênica e DNAs exógenos capazes de ser transcritos úteis nos constructos de DNA recombinantes da invenção. Quando tal RNA duplo filamento é formado, ele pode suprimir um ou mais genes alvo, e pode formar um único RNA duplo filamento ou múltiplos filamentos duplas de RNA, ou um único "stem" ou múltiplos "stems" de RNA duplo filamento. On-

5 de múltiplos "stems" de RNA duplo filamento são formados, eles podem ser arranjados em arranjos de "cabeça de martelo" ou "folha de trevo". Em algumas modalidades, os "stems" de filamento dupla podem formar um arranjo em "pseudo-nó" (por exemplo, quando o RNA espaçador ou de alça de um

10 "stem" de filamento dupla forma parte de um segundo "stem" de filamento dupla); vide, por exemplo, descrições de arquiteturas de pseudo-nós em Staple & Butcher (2005) *PLoS Biol.*, 3(6):e213. DNA espaçador (localizado entre ou adjacente a regiões de dsRNA) é opcional mas comumente incluído e geralmente inclui DNA que não corresponde ao gene alvo (embora em al-

15 gumas modalidades possa incluir DNA sentido ou anti-sentido do gene alvo). DNA espaçador pode incluir seqüência que transcreve RNA de filamento simples ou pelo menos RNA de filamento parcialmente dupla (tal como em um arranjo "kissing stem-loop") ou um RNA que assume uma estrutura secundária ou configuração tridimensional (por exemplo, uma grande alça de

20 seqüência anti-sentido do gene alvo ou um aptâmero) que confere ao transcrito uma característica adicional desejada, tal como estabilidade aumentada, meia-vida *in vivo* aumentada ou especificidade por célula ou tecido.

Exemplo 2

Esse exemplo descreve um método não limitante de determinação da utilidade potencial de um sítio de reconhecimento de miRNAs, pela

25 determinação do padrão de expressão de miRNA. O conhecimento da distribuição espacial ou temporal de uma dada expressão de miRNA é útil, por exemplo, ao desenhar constructos recombinantes a serem expressos de uma maneira espacialmente ou temporalmente específica. Esse exemplo

30 descreve padrões de expressão de miRNA maduro no milho e fornece seqüências de sítios de reconhecimento para esses miRNAs que são adequados para inclusão em constructos de DNA recombinante úteis no milho e em outras plantas.

RNA total foi isolado de plantas de milho LH244 usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sete estágios de desenvolvimento foram usados, incluindo raízes e meristemas de ramos de mudas em germinação, folhas jovens (V1 a V2) e adultas (V7 a V8), caule internodal, pendão antes da queda, e espigas imaturas (de aproximadamente 1") (2,54 cm). Cinco microgramas de RNA total foram separados em PAGE-Ureia 17% como descrito por Allen *et al.* (2004) *Nat. Genet.*, 36:1282-1290. Os blots foram marcados com oligonucleotídeos de DNA que eram anti-sentido para a sequência de pequeno RNA e marcados na extremidade com gama ^{32}P -ATP usando Optikinase (USB). As sondas usadas e suas respectivas seqüências são dadas na Tabela 1.

Tabela 1

SEQ ID NO.	Seqüência	miRNA
1	GTGCTCACTCTCTTCTGTCA	miR156, miR157
2	TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA	miR159
3	TGGCATCCAGGGAGCCAGGCA	miR160
4	CTGGATGCAGAGGTTTATCGA	miR162
5	TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA	miR164
6	GGGGAATGAAGCCTGGTCCGA	miR166
7	TAGATCATGCTGGCAGCTTCA	miR167
8	TTCCCGACCTGCACCAAGCGA	miR168
9	TCGGCAAGTCATCCTTGGCTG	miR169
10	GATATTGGCGCGGCTCAATCA	miR171
11	CTGCAGCATCATCAAGATTCT	miR172
12	GGCGCTATCCCTCCTGAGCTT	miR390
13	GATCAATGCGATCCCTTTGGA	miR393
14	TGGGGTCCTTACAAGGTCAAGA	TAS3 5'D7(+)
15	GGAGGTGGACAGAATGCCAA	miR394
16	GAGTTCCCCCAAACACTTCAC	miR395
17	CATCAACGCTGCGCTCAATGA	miR397
18	CGGGGGCGACCTGAGAACACA	miR398
19	AGCCAGGGAAGAGGCAGTGCA	miR408

Os resultados são mostrados na **Figura 3**. Uma sonda (**SEQ ID NO:1**) hibridizou com miRNAs maduros de duas famílias (miR156 e miR157). miRNAs maduros individuais foram expressos em níveis diferentes em células ou tecidos específicos. Por exemplo, Zm-miR390 não foi expresso ou expresso apenas em níveis baixos em raiz e folha adulta.

Exemplo 3

Esse exemplo não limitante descreve constructos de DNA recombinante da invenção, úteis para suprimir a expressão de um RNA alvo em uma célula específica de ou derivada de um eucarioto multicelular tal como uma célula de planta ou uma célula de animal e métodos para seu uso. Os constructos incluem um promotor operativamente ligado ao DNA que transcreve RNA incluindo pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro expresso em uma célula específica de um eucarioto multicelular, e um RNA alvo a ser suprimido na célula específica, em que o dito RNA alvo é para ser expresso em células do eucarioto multicelular diferentes da célula específica.

Promotores constitutivos fortes que são expressos em aproximadamente todas as células de planta foram identificados (por exemplo, CaMC 35S, OsAct), mas promotores específicos fortes espacialmente específicos (específico para célula ou tecido) e temporalmente específicos foram menos bem caracterizados. Para limitar a expressão de RNA alvo ou transgene para um tipo específico de célula ou tecido na ausência de um promotor forte específico para célula ou para tecido, pode ser desejável suprimir em células ou tecidos selecionados a expressão de um transcrito sob o controle de um promotor constitutivo. A invenção fornece métodos que usam seqüências de reconhecimento de miRNAs endógenos para suprimir a expressão de um RNA alvo constitutivamente expresso em células específicas.

Métodos da invenção permitem controle pós-transcricional espacialmente ou temporalmente específico de expressão de um RNA alvo em que a transcrição é direcionada por um promotor não-específico (por exemplo, constitutivo). Os métodos da invenção permitem, por exemplo, a expressão restrita de um gene transcrito por um promotor constitutivo ou um promotor com expressão além do(s) tipo(s) de célula ou tecido desejados. A expressão restrita pode ser restrita espacialmente ou temporalmente, por exemplo, restrita aos tipos ou classes específicas de tecidos ou células ou a estágios específicos de desenvolvimento, reprodução, crescimento e sazonal. Onde um miRNA é expresso sob condições particulares (por exemplo, sob estresse biótico tal como aglomeração, interações alelopáticas ou infes-

tação por praga ou patógeno, ou estresse abiótico tal como estresse pelo calor ou frio, estresse por estiagem, estresse nutricional, estresse por metal pesado ou sal), o sítio de reconhecimento de miRNA correspondente pode ser usado para supressão condicionalmente específica, isto é, para suprimir o RNA alvo sob a condição particular.

Por exemplo, Zm-miR162 é pobremente expresso em raízes de milho (vide **Exemplo 2** e **Figura 3**), portanto, desenhar um constructo de expressão para incluir um sítio de reconhecimento de miRNA162 exógeno adjacente a, ou dentro de, um RNA alvo constitutivamente expresso, pode limitar o acúmulo de RNA alvo transcrito em todas as células de uma planta de milho com exceção das raízes. Esse método tem utilidade para todas as aplicações de expressão gênica em que o dado miRNA maduro é expresso.

Em eucariotos multicelulares, incluindo plantas, microRNAs (miRNAs) regulam genes endógenos por um mecanismo de clivagem pós-transcricional, que pode ser espacialmente ou temporalmente específico. A presente invenção fornece métodos pelos quais a adição de um sítio de reconhecimento de miRNA a um transgene expresso constitutivamente poderia ser usada para limitar a expressão do transgene às células que não têm, ou distantes daquelas que expressam, o miRNA maduro complementar tanto espacialmente quanto temporalmente (incluindo condicionalmente). A manipulação desses sítios de reconhecimento de miRNA em novos transcritos introduzidos em células de planta transgênicas e plantas transgênicas derivadas dessas células, é útil para alterar padrões de expressão para o novo transgene.

Em uma abordagem alternativa, um sítio de reconhecimento de miRNA existente (nativo ou endógeno) é mutado (por exemplo, por mutagenese química) o suficiente para reduzir ou impedir a clivagem (vide Mallory *et al.* (2004) *Curr. Biol.*, 14:1035-1046). Dessa maneira, uma sequência de RNA alvo com efeitos desejáveis, por exemplo, tamanho da folha ou semente aumentado, pode ser expressa em níveis maiores do que quando o sítio de reconhecimento de miRNA nativo ou endógeno estava presente. Uma modalidade é substituir um gene nativo por um homólogo manipulado, em

que o miRNA nativo tenha sido mutado ou até deletado, isto é menos suscetível a clivagem por um dado miRNA.

Uma modalidade do método é a introdução de pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno (tipicamente uma sequência de 21 nucleotídeos) nas regiões não traduzidas 5' ou 3' de um RNA alvo, ou dentro do RNA alvo. Onde o RNA alvo inclui a sequência codificante, o pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno pode ser introduzido na região codificante do RNA alvo. Isso resulta na expressão reduzida do RNA alvo em tipos de tecidos ou células que expressam o miRNA maduro correspondente. Pela inclusão de um sítio de reconhecimento que corresponde a um miRNA maduro em um transcrito de RNA alvo, é possível modular a expressão do RNA alvo de tal maneira que mesmo sob o controle de um promotor constitutivo, o RNA alvo é expresso apenas em células ou tecidos selecionados ou durante períodos temporais selecionados. Isso permite tanto os altos níveis de expressão obteníveis com promotores constitutivos fortes quanto a limitação espacial ou temporal de tal expressão.

Qualquer sítio de reconhecimento de miRNA pode ser usado, preferivelmente onde a expressão do miRNA maduro correspondente tenha sido determinada para satisfazer a expressão ou supressão desejada do RNA alvo. Várias sequências de reconhecimento de miRNA são conhecidas. Vide, por exemplo, Jones-Rhoades & Bartel (2004). *Mol. Cell*, 14:787-799, Rhoades *et al.* (2002) *Cell*, 110:513-520, Allen *et al.* (2004) *Nat. Genet.*, 36:1282-1290). Vide também a base de dados na rede ASRP (Gustafson *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:D6379-D640). Exemplos não limitantes de sítios de reconhecimento de miRNA úteis em constructos e métodos da invenção incluem aqueles fornecidos na **Tabela 2**, que dá as sequências de sítio de reconhecimento para a família de miRNA indicada e indica a distribuição entre "todas as plantas" (isto é, plantas inferiores, monocotiledôneas e dicotiledôneas), monocotiledôneas e/ou dicotiledôneas. A espécie de planta a partir da qual o miRNA foi identificado e as abreviações usadas foram: *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Gossypium hirsutum* (Gh), *Hordeum vulgare* (Hv), *Lycopersicum esculentum* (Le), *Lotus corniculatus* var.

- japonicus* (sinônimo de "*Lotus japonicus*") (Lj), *Medicago truncatula* (Mt), *Mesembryanthemum crystallinum* (Mc), *Oryza sativa* (Os), *Pennisetum glaucum* (Pg), *Phaseolus vulgaris* (Pv), *Populus tremula* (Pt), *Saccharum officinarum* (So), *Sorghum bicolor* (Sb), *Theobroma cacao* (Tc), *Triticum aestivum* (Ta), *Vitis vinifera* (Vv), e *Zea mays* (Zm).

Tabela 2

SEQ ID NO.	Sítio de reconhecimento de miRNA	Seqüência do Sítio de Reconhecimento
Seqüência de reconhecimento da família miR156– todas as plantas		
20	At1g27370	GUGCUCUCUCUCUUCUGUCA
21	At1g53160	CUGCUCUCUCUCUUCUGUCA
22	At2g33810	UUGCUCUACUCUCUUCUGUCA
23	At3g15270	CCGCUCUCUCUCUUCUGUCA
Seqüência de reconhecimento da família miR159– todas as plantas		
24	At5g06100	UGGAGCUCCCUUCAUUCCAAU
25	At2g26960	UCGAGUUCUUUUAUUCCAAU
26	At4g26930	AUGAGCUCUCUUCUAAACCAAA
27	At2g26950	UGGAGCUCCCUUCAUUCCAAAG
28	At2g32460	UAGAGCUUCCUUCUAAACCAAA
29	At3g60460	UGGAGCUCCAUUCGAUCCAAA
30	At5g55020	AGCAGCUCCCUUCUAAACCAAA
31	PvMYB	CAGAGCUCCCUUCACUCCAAU
32	VvMYB	UGGAGCUCCCUUCACUCCAAU
33	HvMYB33	UGGAGCUCCCUUCACUCCAAAG
34	OsMYB33	UGGAGCUCCCUUUAUUCCAAU
Seqüências alvo da família miR160– todas as plantas		
35	At1g77850	UGGCAUGCAGGGAGCCAGGCA
36	At2g28350	AGGAAUACAGGGAGCCAGGCA
37	At4g30080	GGGUUUACAGGGAGCCAGGCA
38	OsARF	AGGCAUACAGGGAGCCAGGCA
39	LjARF	AAGCAUACAGGGAGCCAGGCA

Tabela 2 continuação

Seqüências alvo da família miR161 – <i>Arabidopsis</i>		
40	At5g41170	ACCUGAUGUAAUCACUUUCAA
41	At1g06580	CCCGGAUGUAAUCACUUUCAG
42	At1g63150	UUGUUACUUUCAUGCAUUGA
43	At5g16640	CCCUGAUGUAUUUACUUUCAA
44	At1g62590	UAGUCACGUUCAUGCAUUGA
45	At1g62670	CCCUGAUGUAUUCACUUUCAG
46	At1g62860	CCCUGAUGUUGUUACUUUCAG
47	At1g62910	UAGUCACUUUCAGCGCAUUGA
48	At1g62930	UCCAAAUGUAGUCACUUUCAG
49	At1g63080	UCCAAAUGUAGUCACUUUCAA
50	At1g63130	UCCAAAUGUAGUCACUUUCAG
51	At1g63400	UCCAAAUGUAGUCACUUUCAA
52	At1g63230	UUGUAAACUUUCAGUGCAUUGA
53	At1g63330	UAGUCACGUUCAUGCAUUGA
54	At1g63630	UUGUUACUUUCAGUGCAUUGA
55	At1g64580	CCCUGAUGUUGUCACUUUCAC
56	At2g41720	UUGUUACUUACAAUGCAUUGA
57	At1g63070	UAGUCUUUUUCAACGCAUUGA
Seqüências alvo da família miR162– monocotiledôneas e dicotiledôneas		
58	At1g01040	CUGGAUGCAGAGGUAAUUAUCGA
59	PtDCL1	CUGGAUGCAGAGGUCUUAUCGA
60	OsDCL1	CUGGAUGCAGAGGUUUUAUCGA
Seqüências alvo da família miR163 – <i>Arabidopsis</i>		
61	At1g66700	AUCGAGUUCCAAGUCCUCUUCAA
62	At1g66720	AUCGAGUUCCAGGUCCUCUUCAA
63	At3g44860	AUCGAGUUCCAAGUUUUCUUCAA

Tabela 2 (continuação)

Seqüências alvo da família miR163 – <i>Arabidopsis</i>		
64	At1g56010	AGCACGUACCCUGCUUCUCCA
65	At5g07680	UUUACGUGCCCUGCUUCUCCA
66	At5g53950	AGCACGUGUCCUGUUUCUCCA
67	At5g61430	UCUACGUGCCCUGCUUCUCCA
68	At5g39610	CUCACGUGACCUGCUUCUCCG
69	OsNAC1	CGCACGUGACCUGCUUCUCCA
70	MtNAC	CUUACGUGUCCUGCUUCUCCA
71	GmNAC	CUUACGUGCCCUGCUUCUCCA
72	LeNAC	GCCACGUGCACUGCUUCUCCA
Seqüências alvo da família miR165/166 – todas as plantas		
73	At1g30490	UUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG
74	At5g60690	CUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG
75	At1g52150	CUGGAAUGAAGCCUGGUCCGG
76	PtHDZPIII	CCGGGAUGAAGCCUGGUCCGG
Seqüências alvo da família miR167– monocotiledôneas e dicotiledôneas		
77	At1g30330	GAGAUCAAGCUGGCAGCUUGU
78	At5g37020	UAGAUCAAGCUGGCAGCUUGU
79	OsARF6	AAGAUCAAGCUGGCAGCUUGU
Seqüências alvo da família miR168 – todas as plantas		
80	At1g48410	UUCCCGAGCUGCAUCAAGCUA
Seqüências alvo da família miR169 – todas as plantas		
81	At1g17590	AAGGGAAGUCAUCCUUGGCUG
82	At1g54160	ACGGGAAGUCAUCCUUGGCUA
83	At1g72830	AGGGGAAGUCAUCCUUGGCUA
84	At3g05690	AGGCAAUUAUUCUUGGCUCA
85	At3g20910	GCGGCAAUUAUUCUUGGCUU
86	At5g12840	CCGGCAAUUAUUCUUGGCUU
87	At3g14020	AAGGGAAGUCAUCCUUGGCUA

Tabela 2 continuação

Seqüências alvo da família miR169 – todas as plantas		
88	ZmHAP2	GUGGCAACUCAUCCUUGGCUC
89	VvHAP2	UGGGCAAUUCAUCCUUGGCUU
90	OsHAP2	AUGGCAAUUCAUCCUUGGCUU
91	GmHAP2	UAGGGAAGUCAUCCUUGGCUC
92	GhHAP2	CUGGGAAGUCAUCCUUGGCUC
Seqüências alvo da família de miR170/171– todas as plantas		
93	At2g45160	GAUUAUUGGCGCGGCUCAAUCA
Seqüências alvo da família miR172 – todas as plantas		
94	At4g36920	CUGCAGCAUCAUCAGGAUUCU
95	At2g28550	CAGCAGCAUCAUCAGGAUUCU
96	At5g60120	AUGCAGCAUCAUCAGGAUUCU
97	At5g67180	UGGCAGCAUCAUCAGGAUUCU
97	At2g39250	UUGUAGCAUCAUCAGGAUUC
99	At3g54990	UUGCAGCAUCAUCAGGAUUC
Seqüências alvo da família miR319 – todas as plantas		
100	At4g18390	CAGGGGGACCCUUCAGUCCAA
101	At1g53230	GAGGGGUCCCCUUCAGUCCAU
102	At3g15030	GAGGGGUCCCCUUCAGUCCAG
103	At2g31070	AAGGGGUACCCUUCAGUCCAG
104	At1g30210	UAGGGGGACCCUUCAGUCCAA
105	OsPCF5	GAGGGGACCCCUUCAGUCCAG
106	OsPCF8	UCGGGGCACACUUCAGUCCAA
107	At1g12820	AAACAAUGCGAUCCCUUUGGA
108	At4g03190	AGACCAUGCGAUCCCUUUGGA
109	At3g23690	GGUCAGAGCGAUCCCUUUGGC
110	At3g62980	AGACAAUGCGAUCCCUUUGGA
Seqüências alvo da família miR394 – monocotiledôneas e dicotiledôneas		
111	At1g27340	GGAGGUUGACAGAAUGCCAAA

Tabela 2 continuação

Seqüências alvo da família miR395 – monocotiledôneas e dicotiledôneas		
112	At5g43780	GAGUUCCUCCAAACACUUCAU
113	At3g22890	GAGUUCCUCCAAACUCUUCAU
114	At5g10180	AAGUUCUCCCAAACACUUCAA
Seqüências alvo da família miR396 – monocotiledôneas e dicotiledôneas		
115	At2g22840	UCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA
116	At2g36400	CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA
117	At4g24150	UCGUUCAAGAAAGCAUGUGGAA
118	At2g45480	ACGUUCAAGAAAGCUUGUGGAA
119	At3g52910	CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA
Seqüências alvo da família miR397– monocotiledôneas e dicotiledôneas		
120	At2g29130	AAUCA AUGCUGCACUCAAUGA
121	At2g38080	AGUCAACGCUGCACUUA AUGA
122	At2g60020	AAUCA AUGCUGCACUUA AUGA
Seqüências alvo da família miR398 – monocotiledôneas e dicotiledôneas		
123	At1g08830	AAGGGGUUUCUGAGAU CACA
124	At2g28190	UGC GGGUGACCUGGGAA CAUA
125	At3g15640	AAGGUGUGACCUGAGAAUCACA
Seqüências alvo da família miR173 – <i>Arabidopsis</i>		
126	AtTAS1a	GUGAUUUUUCUCAACAAGCGAA
127	AtTAS1c	GUGAUUUUUCUCUACAAGCGAA
128	AtTAS2	GUGAUUUUUCUCUCCAAGCGAA
Seqüências alvo da família miR399– monocotiledôneas e dicotiledôneas		
129	At2g33770	UAGGGCAUAUCUCCUUUGGCA
130	At2g33770	UUGGGCAA AUCUCCUUUGGCA
131	At2g33770	UCGAGCAA AUCUCCUUUGGCA
132	At2g33770	UAGAGCAA AUCUCCUUUGGCA
133	At2g33770	UAGGGCAA AUCUUCUUUGGCA
134	OsE2UBC	UAGGGCAA AUCUCCUUUGGCA

Tabela 2 continuação

Seqüências alvo da família miR399– monocotiledôneas e dicotiledôneas		
135	OsE2UBC	CUGGGCAAUUCUCCUUUGGCA
136	OsE2UBC	UCGGGCAAUUCUCCUUUGGCA
137	OsE2UBC	CCGGGCAAUUCUCCUUUGGCA
138	PtE2UBC	GCGGGCAAUUCUCCUUUGGCA
139	MtE2UBC	AAGGGCAAUUCUCCUUUGGCA
140	TaE2UBC	UAGGGCAAUUCUCCUUUGGCG
141	TaE2UBC	CUGGGCAAUUCUCCUUUGGCG
142	TaE2UBC	UUCGGCAAUUCUCCUUUGGCA
Seqüências alvo da família miR403 – dicotiledôneas		
143	At1g31280	GGAGUUUGUGCGUGAAUCUAAU
Seqüências alvo da família miR390– todas as plantas		
144	At3g17185	CUUGUCUAUCCCUCCUGAGCUA
145	SbTAS3	UAUGUCUAUCCCUUCUGAGCUG
146	SoTAS3	UAUGUCUAUCCCUUCUGAGCUA
147	ZmTAS3	UAUGUCUAUCCCUUCUGAGCUG
148	OsTAS3	UCGGUCUAUCCCUCCUGAGCUG
149	PgTAS3	UUAGUCUAUCCCUCCUGAGCUA
150	VvTAS3	AUUGCCUAUCCCUCCUGAGCUG
151	TcTAS3	CCUUGCUAUCCCUCCUGAGCUG
152	LeASR	CUUGUCUAUCCCUCCUGAGCUG
153	ZmTAS3	CCCUUCUAUCCCUCCUGAGCUA
154	PtTAS3	CUUGUCUAUCCCUCCUGAGCUA
155	OsTAS3	CCCUUCUAUCCCUCCUGAGCUA
156	TaTAS3	CCCUUCUAUCCCUCCUGAGCUA
157	HvTAS3	CCUUUCUAUCCCUCCUGAGCUA
158	PtTAS3	CCUGUCUAUCCCUCCUGAGCUA
159	McTAS3	UGUGUCUAUCCCUCCUGAGCUA

Tabela 2 continuação

Seqüências alvo da família miR447 – <i>Arabidopsis</i>		
160	At5g60760	UGACAAACAUCUCGUCCCCAA
161	At3g45090	UGACAAACAUCUCGUUCCUAA
Seqüências alvo da família miR408 - monocotiledôneas e dicotiledôneas		
162	At2g02850	CCAAGGGAAGAGGCAGUGCAU
163	At2g30210	ACCAGUGAAGAGGCUGUGCAG
164	At2g47020	GCCAGGGAAGAGGCAGUGCAU
165	At5g05390	GCCGGUGAAGAGGCUGUGCAA
166	At5g07130	GCCGGUGAAGAGGCUGUGCAG
Seqüências alvo de ta-siRNA de TAS3 - monocotiledôneas e dicotiledôneas		
167	At2g33860a	AGGGUCUUGCAAGGUCAAGAA
168	At5g60450a	AAGGUCUUGCAAGGUCAAGAA
169	Semelhante OsARF3	GAGGUCUUGCAAGGUCAAGAA
170	Semelhante OsARF2	ACGGUCUUGCAAGGUCAAGAA
Seqüências alvo de TAS1/TAS2 - <i>Arabidopsis thaliana</i>		
171	Atg12770	AGAACUAGAGAAAGCAUUGGA
172	Atg12770	AGAGUAAGAUGGAGCUUGAUA
173	At1g63130	AGAUGGUGGAAAUGGGUAUAUC
174	At1g63230	UUGUUGAUCGUAUGGUAGAAG
175	At1g62930	GGUAUUCGAGUAUCUGCAAAA

Assim, uma planta transgênica que expressa um constructo de DNA recombinante que, sob o controle de um promotor constitutivo (por exemplo, um promotor 35S) transcreve um RNA que contém um sítio de reconhecimento de Zm-miR390 e um RNA alvo poderia seria esperado mostrar supressão da expressão do RNA alvo na raiz e folha adulta em relação à expressão em outros tecidos.

Em outro exemplo, Zm-miR172 foi expresso em altos níveis no caule e não expresso, ou expresso apenas em baixos níveis em outros tecidos. Uma planta transgênica que expressa um constructo que, sob o controle de um promotor constitutivo forte (por exemplo, um promotor 35S de

CaMV) transcreve um RNA que contém um sítio de reconhecimento de Zm-miR172 e um RNA alvo seria esperada expressar aquele RNA alvo em níveis mais elevados em outros tecidos que não o caule (onde a expressão do RNA alvo seria suprimida).

5 Para ilustrar o uso dos constructos e métodos da invenção para controlar a expressão de um gene de interesse, um gene repórter é usado como o próprio gene de interesse ou como um substituto do gene de interesse. Por exemplo, onde a expressão de um gene repórter (por exemplo, proteína verde fluorescente, GFP) é desejada no caule do milho e no tecido
10 da espiga imatura, um sítio alvo de miR156 é incluído em um cassete de expressão de GFP e expresso em uma planta de milho estavelmente transgênica sob o controle do promotor CaMV35S. Em outros tecidos (por exemplo, raízes, folhas e pendões), a expressão de GFP é suprimida. O fenótipo de supressão pode ser limitado a tipos celulares muito específicos dentro dos
15 tecidos suprimidos, com células vizinhas mostrando expressão ou um gradiente de expressão de GFP adjacente àquelas células que expressam miR156 maduro.

 Em outro exemplo, um promotor constitutivo forte é usado para direcionar a expressão de uma proteína ou fragmento de proteína inseticida
20 de *Bacillus thuringiensis* ("Bt"), onde um sítio de reconhecimento de miRNA expresso especificamente no pólen está incluído no constructo, resultando em expressão forte de Bt em tecidos da planta exceto para o pólen.

 Um exemplo específico, não limitante do método é a inclusão do sítio de reconhecimento para pelo menos um miRNA, que não é expresso
25 (ou expresso apenas em baixos níveis) nas raízes, em um constructo de DNA recombinante que inclui um RNA alvo do qual a expressão é desejada apenas nas raízes. Um promotor constitutivo forte (por exemplo, 35S intensificado) pode ainda ser usado, mas a expressão do RNA alvo está restrita agora às células que não expressam o miRNA maduro correspondente. Um
30 exemplo específico dessa abordagem é a inclusão de um sítio de reconhecimento de miRNA162 de milho, miRNA164 de milho ou miRNA390 de milho (ou qualquer combinação desses) em um constructo de DNA recombinante

para expressão de uma proteína ou fragmento de proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis* ("Bt", vide, por exemplo, as seqüências inseticidas de *Bacillus thuringiensis* e métodos de uso dessas descritos na Patente U.S. Número 6.953.835 e no Pedido de Patente Provisório U.S. Número 60/713.111, depositado em 31 de Agosto de 2005) como o RNA alvo, por exemplo, em um constructo que inclui o cassete de expressão e35S/Bt/hsp17. Esses miRNAs (por exemplo, miRNA162, miRNA164, ou miRNA390) não são substancialmente expressos em raízes de milho mas são expressos na maioria dos outros tecidos. A inclusão de um ou mais desses sítios de reconhecimento dentro de um cassete de expressão, reduz a expressão de transcritos na maioria dos tecidos diferentes da raiz, mas mantém altos níveis de expressão de RNA alvo de Bt nas raízes, como é desejável para o controle de pragas tais como larva da raiz do milho. Em modalidades similares, combinações de sítios de reconhecimento de miRNA diferentes são incluídas no constructo a fim de se obter o padrão de expressão desejado em um ou mais tecidos específicos.

Exemplos específicos não limitantes de seqüência de DNA capaz de ser transcrita que inclui um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno estão descritos na **Figura 4** e **Figura 5**. A **Figura 4** descreve TIC809 direcionado para cloroplasto com um sítio de reconhecimento de miRNA162 (texto em negrito) localizado na região 3' não traduzida (**SEQ ID NO. 176**). **Figura 5** descreve TIC809 não direcionado com um sítio de reconhecimento de miRNA164 (texto em negrito) localizado na região 3' não traduzida (**SEQ ID NO. 177**).

25 Exemplo 4

Esse exemplo descreve a identificação de um gene *MIR* de uma planta de cultivo com expressão tecido-específica e identificação do promotor do gene miR. Mais particularmente, esse exemplo descreve o perfil de transcrição como um método não limitante de identificar um miRNA expresso especificamente em tecido reprodutivo feminino (endosperma), assim como a identificação de uma seqüência promotora de miR167 de milho com expressão endosperma-específica. O sítio de reconhecimento correspondente

a esse miRNA é útil, por exemplo, na produção de plantas transgênicas com esterilidade feminina induzível de acordo com essa invenção.

Um membro da família de genes MIR167 (**SEQ ID NO. 178**) foi descoberto representar cerca de um quarto da população de pequeno RNA clonada do endosperma do milho em desenvolvimento. Para determinar se
5 um único membro da família de genes MIR167 é responsável pela forte expressão observada no endosperma, vários genes de MIR167 foram analisados por RT-PCR. Nove seqüências stem-loop de MIR167 de *Zea mays* foram encontradas no registro público de miRNA ("miRBase", disponível na
10 rede em microrna.sanger.ac.uk/sequences) listadas como miR167a até miR167i. RT-PCR tecido-específico foi realizado para várias das seqüências de miR167 de *Z. mays* usando iniciadores gene-específicos para a síntese de cDNA de primeiro filamento seguido por PCR com pares de iniciadores gene-específicos. A expressão de miR167 foi forte e específica para tecido
15 de endosperma (15, 20 dias após a polinização).

Para determinar se miR167g é abundantemente expresso no endosperma, Northern blots de milho (LH59) foram preparados. O blot foi marcado com uma sonda de LNA de 22-mer de miR167 madura com extremidade marcada (**Figura 6A**), **stripped**, e re-marcado com uma sonda de
20 ~400bp gene miR167g-específica (**Figura 6B**). O forte sinal do endosperma observado indicou que miR167g é amplamente responsável pela expressão aumentada no endosperma. O perfil de transcrição de tecidos de milho confirmaram os resultados do Northern blot (**Figura 6C**); o transcrito que corresponde a miR167g estava abundantemente e especificamente expresso em
25 tecido de endosperma.

Uma seqüência de cDNA de 804 pares de base disponível publicamente no GenBank (apontada como "ZM_BFb0071120.r ZM_BFb *Zea mays* cDNA 5', mRNA sequence") e que tem o número de acesso DR827873.1 (GI:71446823) está incorporada aqui por referência. Essa seqüência inclui
30 um segmento (**SEQ ID NO. 178**) que corresponde ao miR167g maduro. Usando a seqüência pública, a análise de bio-informática foi realizada na a seqüência genômica de milho patenteada. Um grupamento genômico de

4,75 quilobases que inclui a sequência da linhagem B73 de milho natural foi identificado como contendo seqüências de genes previstas para miR167a e miR167g. Uma região de 486 pares de bases entre os dois genes miR167 foi identificada como tendo homologia a uma seqüência de sinalizador de seqüência expressa (EST). Motivos de promotor foram identificados nas seqüências à montante de ambos os transcritos previstos (miR167a e miR167g). Uma região de 1682 pares de bases (**SEQ ID NO. 179**) entre os transcritos de miR167a e miR167g previstos, e uma região menor de 674 pares de bases (**SEQ ID NO. 180**) entre o EST e o transcrito de miR167g previsto foi identificada como seqüências promotoras de miR167g. Subgrupos dessas seqüências (por exemplo, pelo menos cerca de 50, cerca de 100, cerca de 150, cerca de 200, cerca de 250 ou cerca de 300 nucleotídeos de **SEQ ID NO. 179** ou **SEQ ID NO. 180** ou fragmentos de pelo menos cerca de 50, cerca de 100, cerca de 150 e cerca de 200 nucleotídeos contíguos que tem pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade a um segmento de **SEQ ID NO. 179** ou **SEQ ID NO. 180**) também são úteis como promotores; seus efeitos promotores são demonstráveis por procedimentos bem-conhecidos na técnica (por exemplo, para direcionar a expressão de um gene repórter tal como luciferase ou proteína verde fluorescente). O mapa de anotação, incluindo localizações dos genes de miR167a e miR167g e miRNAs maduros e elementos promotores (por exemplo, TATA boxes), desse grupoamento genômico é mostrado na **Figura 7**. O mapa de anotação também mostra a localização de motivos do fator responsivo a auxina (ARF) ou elementos de resposta a auxina com a seqüência TGTCTC (**SEQ ID NO. 181**), que indica que a auxina pode regular a expressão de miR167g. miRNAs de miR167 maduro são complementares a ARF6 e ARF8 (que codificam ARFs ativadoras) e tem sido propostos com regulando a homeostase da auxina; vide, por exemplo, Rhoades *et al.* (2002) *Cell*, 110:513-520, Bartel & Bartel (2003) *Plant Physiol.*, 132:709-717, Ulmasov *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5844-5849, e Mallory *et al.* (2005) *Plant Cell*, 17:1360-1375.

Além das seqüências promotoras de miR167g (**SEQ ID NO. 179** e **SEQ ID NO. 180**) identificadas da linhagem B73 de milho natural, duas

seqüências promotoras adicionais de miR167g (**SEQ ID NO. 182** e **SEQ ID NO. 183**) foram amplificadas a partir da linhagem natural LH244 de milho. As extremidade 3' de **SEQ ID NO. 182** e **SEQ ID NO. 183** foram determinadas experimentalmente por 5'RACE (amplificação rápida de extremidades de cDNA, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) de miR167g. A extremidade 5' da seqüência de 768 pares de bases (**SEQ ID NO. 182**) corresponde à extremidade de uma seqüência de DNA de 481 pares de bases disponível publicamente no GenBank (anotada como "QCG17c03.yg QCG Zea mays cDNA clone QCG17c03, seqüência de mRNA") e que tem o número de acesso CF035345.1 (GI:32930533). A extremidade 5' da seqüência de 407 pares de bases (**SEQ ID NO. 183**) corresponde à extremidade de uma seqüência de DNA de 746 pares de bases disponível publicamente no GenBank (anotada como "MEST991_A06.T7-1 UGA-ZmSAM-XZ2 Zea mays cDNA, seqüência de mRNA") e que tem o número de acesso DN214085.1 (GI:60347112).

As seqüências promotoras de miR167g, gene de miR167g, microRNA de miR167g maduro e sítio de reconhecimento de miR167g (exemplos dos quais estão incluídos abaixo na **Tabela 6**) descritas aqui têm várias utilidades como descrito em outro lugar nessa descrição. Em particular, um promotor de miR167g é útil como um promotor endosperma-específico e pode ser usado, por exemplo, para substituir um promotor B32 de milho. Em outra utilidade, a seqüência de miR167g ou miR167g maduro (ou um precursor dessas) é manipulada para suprimir um gene alvo, especialmente quando a supressão deve ser específica para endosperma. O sítio de reconhecimento de miR167g é útil, por exemplo, em constructos para expressão gênica onde o gene deve ser expresso em outros tecidos que não o endosperma e especialmente útil na produção de plantas transgênicas com esterilidade feminina induzível de acordo com essa invenção.

Exemplo 5

Os critérios atuais para identificação de miRNA têm enfatizado a conservação filogenética de miRNAs entre as espécies, e assim alguns miRNAs não conservados ou espécie-específicos em plantas foram caracterizados em plantas. Esse exemplo descreve métodos não limitantes para

identificar miRNAs, seus padrões de expressão no tecido, seus sítios de reconhecimento correspondentes e exemplos de alvos.

Cinco novos miRNAs não-conservados e as correspondentes seqüências *MIR* foram identificados a partir de uma biblioteca de c-DNA fracionada por tamanho construída a partir de folhas de soja. Os critérios para identificação de miRNA incluíram: (1) um clone de pequeno RNA de 21-nt clonado, e um possível miRNA* (fita que corresponde ao miRNA) em uma abundância menor, (2) contenção do duplex de miRNA/miRNA* inteiramente dentro de uma estrutura de foldback pequena, imperfeita, (3) derivação do miRNA a partir de um transcrito de RNA Pol II não codificante de proteína e (4) presença de um sítio alvo complementar em um gene codificante; vide Ambros *et al.* (2003) *RNA*, 9:277-279.

Pequenos RNAs foram extraídos de seqüências brutas que contêm um adaptador e suas fitas foram determinadas. Esse grupo de seqüências foi filtrado para remover pequenas seqüências de RNA que eram RNA de vírus, tRNA, rRNA, de cloroplasto e de mitocôndria, e transgene, resultando em um grupo filtrado de 381.633 supostas seqüências de miRNA. Pequenos RNAs que não se originam das fontes acima e não são homólogos a miRNAs conhecidos foram mapeados com relação a seqüências de cDNA de soja. Para as seqüências de cDNA mapeadas com baixo conteúdo codificante de proteína, um fragmento de seqüência de cDNA de cerca de 250 nucleotídeos, contendo o suposto miRNA, foi dobrado usando RNA Folder. A estrutura de foldback foi examinada para verificar se o pequeno RNA estava localizado no "stem", e se um pequeno RNA extensivamente (mas não perfeitamente) complementar com menor abundância estava localizado no lado oposto do "stem". Os alvos potenciais do pequeno RNA são previstos com base em regras modificadas de Jones-Rhoades & Bartel (2004) *Mol. Cell*, 14:787-799, e Zhang (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:W701-704. A Tabela 3 lista os cinco novos miRNAs não conservados clonados a partir de tecido de folha de soja e para cada um, miRNA* correspondente e primRNA(s); abundância ("abund") é dada como o número de vezes em que a seqüência ocorreu em um total de 381.633 seqüências.

Tabela 3

miRNA		miRNA*		precursor de miRNA	
SEQ ID NO.	seqüência	abund	SEQ ID NO.	seqüência	abund
184	UGAGACCAAAUGAGCAGCUGA	94123	185	GCUGCUCaucugUUCUCAGG	26
187	UAGAAGCUCUCCCAUGUUCUCA	7259	188	GAGCAUGGGUAAAUUCUAU	24
190	UGUUGCGGUAUCUUGCCUC	4127	191	GGCGUAGAUCCCCACAACAG	9
193	UGCGAGUGUCUUCGCCUCUGA	3778	194	GGAGCGUAGAUACUCACACC	70
196	UUGCCGAUUCACCCCAUCCUA	3733	197	GCUGCUCaucugUUCUCAGG	93
					198.199

- Para cada novo miRNA de soja, a estrutura de "foldback" das seqüências de precursor de miRNA foi prevista por um algoritmo ("RNAFolder", baseado em RNAfold, disponível publicamente em www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/RNAfold.html), e o perfil de transcrição do precursor de miRNA
- 5 obtido quando disponível, como listado na **Tabela 4**. Exemplos de alvos previstos (sítios de reconhecimento) em soja e seus padrões de expressão identificados foram identificados para dois dos miRNAs (**SEQ ID NO. 184** e **SEQ ID NO. 187**).

Tabela 4

miRNA SEQ ID NO.	precursor de miRNA	fold-back do miRNA precursor	Perfil de transcrição do precursor de miRNA	Seqüência alvo de <i>G. max</i> prevista (sítio de reconhecimento)	Padrão de expressão do alvo previsto
184	186	vide Figura 8A	vide Figura 8B	polifenol oxidase (SEQ ID NO. 200)	vide Figure 8C
187	189	vide Figura 9A	--	polifenol oxidase (SEQ ID NO. 201)	vide Figure 9B
190	192	vide Figura 10	--	--	--
193	195	vide Figura 11	--	--	--
196	198, 199	vide Figura 12A	vide Figura 12B	--	--

- Além disso, seqüências alvo (sítio de reconhecimento) para cada novo miRNA de soja foram identificadas a partir de bases de dados internos de soja ("MRTC"), como listado na **Tabela 5**. O número de nucleotídeos não pareados entre cada sítio de reconhecimento e a seqüência de miRNA ma-
- 5 duro varia entre 1 a 6 não pareamentos, que podem incluir intervalos ou nucleotídeos "ausentes". Por exemplo, um intervalo é encontrado entre os nucleotídeos 7 e 8 em cada uma das **SEQ ID NO. 220, SEQ ID NO. 221, SEQ ID NO. 223, SEQ ID NO. 224 e SEQ ID NO. 225**.

Tabela 5

miRNA SEQ ID NO. 184			Seqüência de miRNA (3'→5') AGUCGACGAGUAAACCAGAGU			
Máximo Glicina do alvo (sítio de reconhecimento) SEQ ID NO.	Designação da MRTC	Localização do alvo (sítio de reconhecimento)	Seqüência alvo (sítio de reconhecimento)	Pontuação	Não pareamento	
202	MRT3847_253879C.2	153 - 173	ucagcugcucacugucucua	2,5	2	
203	MRT3847_54392C.5	402 - 422	ccagcugcucuuuugucacu	2,5	3	
204	MRT3847_41382C.3	118 - 138	ucagcucucuuuugucucu	2,5	4	
205	MRT3847_319840C.1	408 - 428	ucagcuacugaucuggucuca	3	3	
206	MRT3847_326146C.1	117 - 137	ucagcuguuuccuuuugucucu	3	4	
207	MRT3847_39543C.6	768 - 788	ucagcuguuuccuuuugucucu	3	4	
208	MRT3847_253942C.4	1837 - 1857	guagcuucucacuuggcucua	3	5	
209	MRT3847_260486C.4	124 - 144	uuagcugcucuuucggucucu	3	5	
210	MRT3847_210520C.2	357 - 377	uuagaugcuuuuuggcucuuu	3	6	
miRNA SEQ ID NO. 187			Seqüência de miRNA (3'→5') ACUCUUGUACCCUCGAAGAU			
Máximo Glicina do alvo (sítio de reconhecimento) SEQ ID NO.	Designação da MRTC	Localização do alvo (sítio de reconhecimento)	Seqüência alvo (sítio de reconhecimento)	Pontuação	Não pareamento	
211	MRT3847_303349C.1	435 – 455	ugagaacauggggagccucua	1,5	1	
212	MRT3847_14593C.6	1133 – 1153	agaggacauggggagauucua	2	3	
213	MRT3847_241913C.3	1111 – 1131	agaggacauggggagguucua	2	3	
214	MRT3847_32439C.4	1142 – 1162	ugagaacaugggaaucucua	2,5	2	
215	MRT3847_187197C.5	689 – 709	aaagaacauggggagccucua	2,5	3	
216	MRT3847_33448C.5	1047 – 1067	ugagaacaugggggguuucua	2,5	3	
217	MRT3847_39693C.6	305 – 325	ugugaagguggggagcucuuu	2,5	4	
218	MRT3847_50432C.5	89 – 109	ggagaacaugcagagcucucug	2,5	4	
219	MRT3847_95417C.1	308 – 328	ugagaacacuggggagcucuuuc	2,5	4	
220	MRT3847_115705C.2	82 – 101	ugagaacuggugagcucucug	3	3	

Tabela 5 continuação

miRNA SEQ ID NO. 187			Seqência de miRNA (3'→5')		
Máximo Glicina do alvo (sítio de reconhecimento) SEQ ID NO.	Designação da MRTC	Localização do alvo (sítio de reconhecimento)	Seqência alvo (sítio de reconhecimento)	Pontuação	Não pareamento
221	MRT3847_182667C.1	143 – 162	ugaguacuggggagcuucuc	3	3
222	MRT3847_184995C.1	16 – 36	ugagagcauggguaacuucua	3	3
223	MRT3847_253437C.4	141 – 160	ugagcacuggggagcuucuc	3	3
224	MRT3847_293395C.2	294 – 313	ugagcacuggggagcuucuc	3	3
225	MRT3847_63512C.6	321 – 340	ugagcacuggggagcuucuc	3	3
226	MRT3847_64829C.6	1087 – 1107	ugagaacauggggaacuucua	3	3
227	MRT3847_80470C.3	15 – 35	ugagagcauggguaacuucua	3	3
228	MRT3847_136444C.5	312 – 332	ugagaaccugguagcuucug	3	4
229	MRT3847_231576C.1	360 – 380	ugagaacaucgaaagcuucuu	3	4
230	MRT3847_263317C.1	90 – 110	ugaggacaaggggagcuuaug	3	4
231	MRT3847_304409C.1	217 – 237	cuaaaacauggggagcuucuu	3	4
232	MRT3847_247682C.3	1287 – 1307	ugaggaaaauaggaguuucug	3	5
233	MRT3847_251048C.2	280 – 300	ugagaacaauagugaguuuuuu	3	5
234	MRT3847_270705C.2	575 – 595	uaggauuggggagcuucuc	3	5
235	MRT3847_304509C.2	592 – 612	uaggauuggggagcuucuc	3	5
236	MRT3847_62576C.4	540 – 560	uaggauuggggagcuucuc	3	5
237	MRT3847_67153C.3	661 – 681	gaugaaauagggaguuucua	3	5

Tabela 5 continuação

miRNA SEQ ID NO. 190		seqüência de miRNA (3'→5') CUCCGUUUUCUAUGGCGUUGU				
Máximo Glicina do alvo (sítio de reconhecimento) SEQ ID NO.	Designação da MRTC	Localização do alvo (sítio de reconhecimento)	Seqüência alvo (sítio de reco- nhecimento)	Pontuação	Não pare- amento	
238	MRT3847_106868C.2	318 – 338	ggggcaaggacaucgcaacg	2,5	5	
239	MRT3847_307036C.1	171 – 191	aaggcaaaugcccgcgacg	2,5	5	
240	MRT3847_308816C.2	719 – 739	gaggcaaaugcgcgacacg	3	4	
241	MRT3847_6248C.3	584 – 604	gcggcaaagauacucaacc	3	4	
242	MRT3847_104943C.2	177 – 197	aacgcaaaagagaccuguaaca	3	5	
243	MRT3847_290510C.2	181 – 201	aaggcaaaugcccagcgacg	3	5	
244	MRT3847_294184C.2	1090 – 1110	gagccaaagagaccgcgacg	3	5	
245	MRT3847_321797C.1	847 – 867	aaggcauagauagucgcagca	3	5	
246	MRT3847_63653C.5	1096 – 1116	aaggcaaaugcccagcaaug	3	5	
247	MRT3847_9362C.2	481 – 501	uaggaaaagauacauaaca	3	5	
248	MRT3847_112761C.3	331 – 351	gaggcaaaugucgcaaug	3	6	
249	MRT3847_249731C.3	515 – 535	caggcaaaugucugcaauu	3	6	
250	MRT3847_313052C.1	253 – 273	uagguaggauacuugcaaca	3	6	
251	MRT3847_318082C.1	123 – 143	aaggcaaaugcugcccgcgaug	3	6	
252	MRT3847_160536C.3	182 – 202	ucaggggaggagacacucgca	2	3	
253	MRT3847_290017C.2	304 – 324	uuagaggcaaaagacacucguc	2	4	
254	MRT3847_97323C.1	55 – 75	ucagaggagaagaauacucgug	2	4	
255	MRT3847_182887C.1	43 – 63	ucagaggagaagacacgcgca	2,5	2	
256	MRT3847_290275C.2	177 – 197	ucagagggaagaagacacacgcu	2,5	3	
257	MRT3847_296312C.2	155 – 175	ucagagggaagaagacacacgcu	2,5	3	
258	MRT3847_292252C.2	171 – 191	ucagaggguaggagacacacgcu	2,5	4	
259	MRT3847_206250C.1	306 – 326	ccagaggcggaugcauucgca	2,5	5	

Tabela 5 continuação

miRNA SEQ ID NO. 193		Seqüência de miRNA (3'→5') AGUCUCCGCUUCUGAGCGU			
Máximo Glicina do alvo (sítio de reconhecimento) SEQ ID NO.	Designação da MRTC	Localização do alvo (sítio de reconhecimento)	Seqüência alvo (sítio de reconhecimento)	Pontuação	Não pareamento
260	MRT3847_240825C.3	436 – 456	acagaggcaggacacucgca	2,5	5
261	MRT3847_250458C.2	776 – 796	gcagaggugaagaagcuugca	2,5	5
262	MRT3847_36461C.4	87 – 107	uuagaggagaggaucucgcg	2,5	5
263	MRT3847_48749C.4	715 – 735	gcagaggugaagaagcuugca	2,5	5
264	MRT3847_97362C.3	566 – 586	ucagaggcaaaagauaccgcga	3	3
265	MRT3847_20647C.2	143 – 163	uuagagggaagacacgcgcg	3	4
266	MRT3847_219382C.1	147 – 167	ucagagggaagacacccgcg	3	4
267	MRT3847_243196C.3	73 – 93	ucagaggcuuaagagacuugua	3	4
268	MRT3847_248880C.3	760 – 780	ucagagggaagacacgcgcg	3	4
269	MRT3847_25201C.4	173 – 193	ucagagggaagacacccgcg	3	4
270	MRT3847_264555C.4	212 – 232	ucagagggaagacacacguu	3	4
271	MRT3847_28447C.6	142 – 162	ucagagggaagacacacguu	3	4
272	MRT3847_32431C.4	59 – 79	ucagagggaagacacacguu	3	4
273	MRT3847_99342C.1	116 – 136	ucagagggaagacacccgcg	3	4
274	MRT3847_210811C.2	273 – 293	ucagaaacgaagacgcucguu	3	5
275	MRT3847_240622C.2	92 – 112	uccgagggaagauacucguu	3	5
276	MRT3847_254863C.2	175 – 195	uccgagggaagauacucguc	3	5
277	MRT3847_255345C.3	113 – 133	uccgagggaagauacucguc	3	5
278	MRT3847_257424C.1	378 – 398	gcagaggcuugggcacucgca	3	5
279	MRT3847_38012C.4	56 – 76	uuagagggaagacacacguu	3	5
280	MRT3847_6951C.6	306 – 326	uccgagggaagauacucguu	3	5
281	MRT3847_263266C.4	163 – 183	ucaguggcgaaggcguucguc	3	6
282	MRT3847_272810C.2	502 – 522	uuagagggaugggcacucgug	3	6

Tabela 5 continuação

miRNA SEQ ID NO. 196		Seqüência de miRNA (3'→5') AUCCUUAUACCCACCUUAGCCGUU			
Máximo Glicina do alvo (sítio de reconhecimento) SEQ ID NO.	Designação da MRTC	Localização do alvo (sítio de reconhecimento)	Seqüência alvo (sítio de reconhecimento)	Pontuação	Não pareamento
283	MRT3847_302750C.1	259 - 280	ggggaauuggggaacggcaa	1,5	3
284	MRT3847_136115C.3	661 - 682	ugggaauuggggauggguua	2,5	4
285	MRT3847_235247C.2	694 - 715	ugggaauuggggauggguua	2,5	4
286	MRT3847_21031C.3	1364 - 1385	auggaacuggggaauuggcaa	2,5	5
287	MRT3847_297070C.2	280 - 301	cgggaaaggguuggaauuggcaa	2,5	5
288	MRT3847_248343C.3	392 - 413	uaggaauggggaauuugcaa	3	3
289	MRT3847_207469C.2	1 - 20	ggaauugggugcgugggcaa	3	5
290	MRT3847_216295C.4	537 - 558	caggaaagggggaguggcaa	3	5
291	MRT3847_287795C.2	141 - 162	uagcaauuggguugaucgguga	3	5
292	MRT3847_302511C.2	35 - 56	guugaaugggguugaauuggaaa	3	5
293	MRT3847_312620C.1	46 - 67	guugaaugggguugaauuggaaa	3	5
294	MRT3847_20416C.2	679 - 700	aaggaauggggggaauugguac	3	6
295	MRT3847_297209C.1	289 - 310	cacgaguggggggaucggcg	3	6
296	MRT3847_6639C.4	195 - 216	guggaaugggguugcuugguaa	3	6

Exemplo 6

Esse exemplo descreve métodos não limitantes para identificação de miRNAs de uso na produção de plantas transgênicas com esterilidade induzível utilizáveis em métodos dessa invenção. Mas especificamente, miRNAs que tem um padrão de expressão nos tecidos desejados (isto é, tecidos reprodutivos masculino ou feminino) foram identificados pela avaliação dos dados do perfil de transcrição (TxP).

Um procedimento comum para identificar miRNAs que tem um padrão de expressão nos tecidos desejados (isto é, tecidos reprodutivos masculino ou feminino) inclui as etapas de:

- (a) fornecer uma seqüência inicial de miR que inclui a região "stem-loop", por exemplo, a partir das seqüências de miR disponíveis publicamente na base de dados "miRBase" (disponível na rede em microrna.sanger.ac.uk/sequences);
- (b) aplicar algoritmos de análise de seqüência, tal como BLAST como é bem-conhecido na técnica (vide Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.*, 215:403-410) para identificar seqüências homólogas ou idênticas (por exemplo, seqüências patenteadas em conjuntos de sondas (probeset) de microarranjo feitos com DNA do genoma completo do milho); e
- (c) analisar os perfis de transcrição das seqüências homólogas do conjunto de sondas identificadas na etapa (b) e identificar miRNAs que tem um padrão de expressão nos tecidos desejados (isto é, tecidos reprodutivos masculinos ou femininos).

Preferivelmente, uma quarta etapa é adicionada:

- (d) para seqüências de conjuntos de sonda homólogas descobertas ter os perfis de transcrição desejados, confirmando a identificação do gene de miRNA tanto pelo alinhamento da seqüência de "stem-loop" da seqüência de miR inicial com a seqüência do conjunto de sonda, quanto por miR-

5 NAs potencialmente novos, determinar que a seqüência que é prevista para se dobrar em uma estrutura de "stem-loop" característica de um miRNA. Também preferivelmente, uma etapa opcional é usada, em que uma ou mais comparações com BLAST contra grupos de dados de seqüências adicionais diferentes dos grupos de dados das seqüências do conjunto de sondas são incluídas (antes da etapa (b) acima), permitindo a identificação adicional de sondas que caem fora da região de foldback prevista do gene de miR; falsos positivos, por exemplo, devido a pareamentos nos grupos de dados da seqüência adicional que incluem contigs que sofreram entrançamento incorreto, são identificados pela sua falta de características de miRNA tais como estrutura de foldback apropriada, e removidos.

15 O procedimento acima foi aplicado aos dados do perfil de transcrição patenteado de milho. As **Figuras 13 e 14** descrevem os perfis de transcrição de seqüências de conjuntos de sonda que foram identificados como incluindo genes de miRNA que tem os padrões de expressão desejados, isto é, em tecido reprodutivo feminino (**Figura 13**) e em tecido reprodutivo masculino (**Figura 14**). Vários genes de miRNA e exemplos de seus sítios de reconhecimento correspondentes foram identificados por ser úteis na produção de planta transgênica com esterilidade induzível (**Tabela 6**). Dois membros da família miR166, miR166b e miR166d, partilharam uma seqüência de miRNA maduro idêntica e sítios de reconhecimento correspondentes, mas mostraram diferentes padrões de expressão, com miR166b sendo expresso apenas em embrião e miR166d sendo expresso em óvulo, embrião, estigma e raiz; assim, para fazer plantas indutivamente fêmea estéreis, miR166b seria preferido. Uma modalidade particularmente preferida de um miRNA útil para produção de plantas indutivamente fêmea-estéreis é

30 miR167g específico para endosperma de milho (**SEQ ID NO. 307**), com ou sem G adicional na extremidade 3'; modalidades que têm G adicional na extremidade 3' são 22-mers terminando em GG e tem sítios de reconheci-

- to correspondentes que também são preferivelmente 22-mers onde o nucleotídeo adicionado a extremidade 5' é preferivelmente não pareado (ou seja, não é C). Além da utilidade desses e de miRNAs similares e seus sítios de reconhecimento correspondentes para produção e utilização de plantas transgênicas, indutivamente estéreis, os promotores desses miRNAs maduros são úteis para direcionar a expressão de um transgene para o qual a expressão específica em um tecido reprodutivo é desejada, por exemplo, o promotor de miR167g é útil para direcionar a expressão específica em endosperma.

Tabela 6

Úteis para plantas com esterilidade feminina induzível			
Homólogo de miR	miRNA maduro	Sítio(s) de reconhecimento de miRNA	Padrão de expressão
miR156j	UGACAGAAGAGAGAGAGCACA (SEQ ID NO. 297)	GUGCUCUCUCUCUCUCUGUCA (SEQ ID NO. 298)	Óvulo/semente precoce
		CUGCUCUCUCUCUCUCUGUCA (SEQ ID NO. 299)	
		UUGCUUACUCUCUCUCUGUCA (SEQ ID NO. 300)	
		CCGCUCUCUCUCUCUCUGUCA (SEQ ID NO. 301)	
miR159c	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU (SEQ ID NO. 302)	UGGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 303)	Óvulo/semente precoce
		UCGAGUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 304)	
		AUGAGCUCUCUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 305)	
		UGGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 306)	
		UAGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 307)	
		UGGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 308)	
		AGCAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 309)	
		CAGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 310)	
		UGGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 311)	
		UGGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 312)	
miR166b	UCGGACCAGGCUUCAUUCUCC (SEQ ID NO. 314)	UGGAGCUCUCCUUCUUAUCCAAU (SEQ ID NO. 313)	Embrião
		UUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 315)	
		CUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 316)	
		CUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 317)	
miR166d	UCGGACCAGGCUUCAUUCUCC (SEQ ID NO. 314)	CCGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 318)	Embrião/óvulo/raiz/estigma
		UUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 315)	
		CUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 316)	
		CUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 317)	
		CCGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (SEQ ID NO. 318)	

Tabela 6 continuação

Úteis para plantas com esterilidade feminina induzível				
Homólogo de miR	miRNA maduro	Sítio(s) de reconhecimento de miRNA	Padrão de expressão	
miR167g	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG (SEQ ID NO. 319)	GAGAUACAGGCGGAGCUUGU (SEQ ID NO. 320)	Endosperma	
		UAGAUACAGGCGGAGCUUGU (SEQ ID NO. 321)		
		AAGAUACAGGCGGAGCUUGU (SEQ ID NO. 322)		
miR156i	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC (SEQ ID NO. 323)	GUGCUCUCUCUCUUCUGUCA (SEQ ID NO. 324)	Pólen	
		CUGCUCUCUCUCUUCUGUCA (SEQ ID NO. 325)		
		UUGCUUACUCUCUCUUCUGUCA (SEQ ID NO. 326)		
		CCGCUCUCUCUCUUCUGUCA (SEQ ID NO. 327)		
miR160b-similar	UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA (SEQ ID NO. 328)	UGGCAUGCAGGGAGCCAGGCA (SEQ ID NO. 329)	Pólen	
		AGGAUACAGGGAGCCAGGCA (SEQ ID NO. 330)		
		GGGUUUACAGGGAGCCAGGCA (SEQ ID NO. 331)		
		AGGCAUACAGGGAGCCAGGCA (SEQ ID NO. 332)		
miR393a	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCU (SEQ ID NO. 333)	AAACAAUGCGAUCUUUGGA (SEQ ID NO. 334)	Pólen	
		AGACCAUGCGAUCUUUGGA (SEQ ID NO. 335)		
		GGUCAGAGCGAUCUUUGGC (SEQ ID NO. 336)		
		AGACAAUGCGAUCUUUGGA (SEQ ID NO. 337)		
miR396a	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG (SEQ ID NO. 338)	UCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (SEQ ID NO. 339)	Pólen	
		CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (SEQ ID NO. 340)		
		UCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (SEQ ID NO. 341)		
		ACGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (SEQ ID NO. 342)		
		CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (SEQ ID NO. 343)		

Exemplo 7

Esse é um exemplo não limitante de métodos para fazer de um constructo de DNA recombinante, útil em fazer uma planta transgênica, induzivelmente estéril, que transcreve RNA que inclui: (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é especificamente expresso em tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida; em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo e em que a esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação do herbicida à planta. Um exemplo não limitante de um método para desenhar um sítio de reconhecimento de miRNA para uso em tal constructo de DNA recombinante está ilustrado aqui, em que a planta é milho e a proteína que confere tolerância a um herbicida é 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase; métodos análogos são úteis com outras plantas e outras proteínas.

Esse método inclui as etapas de:

- (a) Selecionar uma seqüência alvo única de pelo menos 18 nucleotídeos específica para o RNA mensageiro que codifica 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Uma abordagem é usar uma pesquisa com BLAST (por exemplo, tanto das bases de dados de cDNA quanto de DNA genômico de milho) para identificar ortólogos de EPSPS e quaisquer combinações potenciais a genes não relacionados, evitando dessa maneira o silenciamento não intencional de seqüências não-alvo.
- (b) Analisar o RNA mensageiro para seqüências indesejáveis (por exemplo, pareamentos com seqüências de espécies não-alvo, especialmente animais) e pontuar cada segmento de 19-mer potencial quanto ao conteúdo de GC, score de Reynolds (vide Reynolds *et al.* (2004) *Nature Biotechnol.*, 22:326-330), e a assimetria funcional caracterizada por uma diferença negativa na energia livre (" $\Delta\Delta G$ ") (vide

Khvorova *et al.* (2003) *Cell*, 115:209-216). Preferivelmente 19-mers são selecionados por terem todas ou a maioria das seguintes características: (1) um escore de Reynolds >4, (2) um conteúdo de GC entre cerca de 40% a cerca de 60%, (3) um $\Delta\Delta G$ negativo, (4) uma adenosina terminal, (5) falta de uma série consecutiva de 4 ou mais dos mesmos nucleotídeos; (6) uma localização próxima da terminação 3' do gene alvo. Preferivelmente, múltiplos 19-mers (3 ou mais) são selecionados para teste.

5

10

(c) Determinar o complemento reverso dos 19-mers selecionados para usar na produção de um miRNA sintético de 21-mer; o nucleotídeo adicional na posição 20 é preferivelmente pareado com a sequência alvo selecionada e o nucleotídeo na posição 21 é preferivelmente escolhido para não ser pareado para impedir a transitoriedade.

15

(d) Testar os miRNAs sintéticos, por exemplo, em um ensaio transitório de *Nicotiana benthamiana* para expressão de miRNA e repressão de alvo.

20

(e) Clonar os miRNAs mais eficazes em um constructo para transformação estável de milho (vide as seções sob os títulos "Fazendo e Usando Constructos de DNA Recombinante" e "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas").

Exemplo 8

25

30

Esse exemplo descreve a produção de plantas transgênicas, indutivamente estéreis e seus usos na produção de semente híbrida. Mais especificamente, esse exemplo descreve a produção de semente de milho híbrido a partir de uma planta parental de milho transgênica, indutivamente macho estéril e uma planta parental transgênica de milho indutivamente fêmea estéril, em que a esterilidade é induzida pela aplicação de herbicida glifosato às plantas parentais.

Constructos de DNA recombinante são desenhados para trans-

- crever (a) um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente no tecido reprodutivo da planta; e (b) RNA mensageiro que codifica uma proteína (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) que confere tolerância ao um herbicida (glifosato);
- 5 em que o miRNA maduro suprime especificamente a expressão da proteína no tecido reprodutivo e em que a esterilidade da planta transgênica é induzível pela aplicação do herbicida à planta. Cada constructo de DNA recombinante inclui uma seqüência que transcreve o RNA mensageiro que codifica
- 10 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* ("EPSPS-CP4"),

ATGCTTCACGGTGCAAGCAGCCGTCCAGCAACTGCTCGTAAGTCCTCTGGTCTTTCT
GGAACCGTCCGTATTCCAGGTGACAAGTCTATCTCCCACAGGTCCTTCATGTTTGA
GGTCTCGCTAGCGGTGAACTCGTATCACCGGTCTTTTGGAAGGTGAAGATGTTATC
AACACTGGTAAGGCTATGCAAGCTATGGGTGCCAGAATCCGTAAGGAAGGTGATACT
TGGATCATTGATGGTGTGGTAACGGTGGACTCCTTGCTCCTGAGGCTCCTCTCGAT
TTCGGTAACGCTGCAACTGGTTGCCGTTTGACTATGGGTCTTGTTGGTGTTTACGAT
TTCGATAGCACTTTCATTGGTGACGCTTCTCTCACTAAGCGTCCAATGGGTCTGTGTG
TTGAACCCACTTCGCGAAATGGGTGTGCAGGTGAAGTCTGAAGACGGTGATCGTCTT
CCAGTTACCTTGCGTGGACCAAAGACTCCAACGCCAATCACCTACAGGGTACCTATG
GCTTCCGCTCAAGTGAAGTCCGCTGTTCTGCTTGCTGGTCTCAACACCCCAGGTATC
ACCACTGTTATCGAGCCAATCATGACTCGTGACCACACTGAAAAGATGCTTCAAGGT
TTTGGTGCTAACCTTACCGTTGAGACTGATGCTGACGGTGTGCGTACCATCCGTCTT
GAAGGTCTGGTAAGCTCACCGGTCAAGTGATTGATGTTCCAGGTGATCCATCCTCT
ACTGCTTTCCCATTTGGTTGCTGCCTTGCTTGTTCCAGGTTCCGACGTCACCATCCTT
AACGTTTTTGATGAACCCAACCCGTAAGTCTCATCTTGACTCTGCAGGAAATGGGT
GCCGACATCGAAGTGATCAACCCACGTCTTGCTGGTGGAGAAGACGTGGCTGACTTG
CGTGTTTCGTTCTTCTACTTTGAAGGGTGTTACTGTTCCAGAAGACCGTGCTCCTTCT
ATGATCGACGAGTATCCAATTCTCGCTGTTGCAGCTGCATTGCTGAAGGTGCTACC
GTTATGAACGGTTTGGGAAGAACTCCGTGTTAAGGAAAGCGACCGTCTTTCTGCTGTC
GCAAACGGTCTCAAGCTCAACGGTGTTGATTGCGATGAAGGTGAGACTTCTCTCGTC
GTGCGTGGTCTCCTGACGGTAAGGGTCTCGGTAACGCTTCTGGAGCAGCTGTGCGCT
ACCCACCTCGATCACCGTATCGCTATGAGCTTCCTCGTTATGGGTCTCGTTTCTGAA

AACCCTGTTACTGTTGATGATGCTACTATGATCGCTACTAGCTTCCCAGAGTTCATG
 GATTTGATGGCTGGTCTTGGAGCTAAGATCGAACTCTCCGACACTAAGGCTGCTTGA
 (SEQ ID NO. 344). Para conveniência de clonagem, cada constructo de DNA
 recombinante também inclui uma seqüência espaçadora na região 3' não
 traduzida (3'UTR) localizada entre o RNA mensageiro e um terminador,
 TgagctcAAGAATTCGAGCTCGGTACCgga**tcc**TCTAGCTAG (SEQ ID NO.
 345, com os sítios de restrição de SacI e BamHI indicados por letras minús-
 culas), que permite a inserção de um sítio de reconhecimento de miRNA en-
 tre os sítios de restrição de SacI e BamHI.

5 O constructo de DNA recombinante para a esterilidade masculi-
 na induzível inclui a seqüência

TgagctcAAGAATTCGAAGACAATGCGATCCCUUUGGAGCTCGGTACCgga
 tccTCTAGCTAG (SEQ ID NO. 346, com os sítios de restrição de SacI e Ba-
 mHI indicados por letras minúsculas), que contém um sítio de reconheci-
 10 mento de miRNA sintético (indicado por texto sublinhado), feito para ser reco-
 nhecido por um miR393, que é altamente expresso no pólen (vide **Exemplo**
6) e é um membro de uma família de miRNA relativamente pequena (redu-
 zindo a possibilidade de que outros membros da mesma família de miRNA
 suprimam EPSPS-CP4 em tecidos diferentes de pólen).

15 O constructo de DNA recombinante para a esterilidade feminina
 induzível inclui a seqüência

TgagctcAAGAATTCGATCCGCTTTCTCTCTTCTGTCAGCTCGGTACCgga**tcc**
 cTCTAGCTAG (SEQ ID NO. 347, com os sítios de restrição de SacI e Ba-
 mHI indicados por letras minúsculas), que contém um sítio de reconheci-
 20 mento de miRNA sintético (indicado pelo texto sublinhado), feito para ser reco-
 nhecido por um miR156j, que é altamente expresso no óvulo e semente pre-
 coce (vide **Exemplo 6**). Esse sítio de reconhecimento de miRNA inclui uma
 única base na posição 14, que pode ser preferivelmente pareada com uma
 seqüência alvo para melhorar a especificidade para o reconhecimento de
 25 miR156j. O pareamento na extremidade 3' do miRNA é reduzido (em relação
 a alvos endógenos), melhorando a especificidade para o reconhecimento de
 miR156j. Isso reduz a possibilidade de que outros membros da família de

miR156 suprimirem EPSPS-CP4 em tecidos diferentes do óvulo e semente precoce.

Cada um dos dois constructos de DNA recombinante (para esterilidade masculina induzível e esterilidade feminina induzível) é individualmente transformado em milho como descrito em "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas". Resumidamente, um vetor para transformação de planta é preparado para cada um dos constructos de DNA recombinante como descrito em "Fazendo e Usando Constructos de DNA Recombinante" e usado para transformar tecido de planta de milho usando transformação mediada por *Agrobacterium* e seleção com glifosato. Plantas transgênicas de cada evento de inserção transgênica são cultivadas até a maturidade e as sementes da progênie são produzidas por autopolinização ou cruzamento de rotina (como descrito em "Fazendo e Usando Células Transgênicas de Planta e Plantas Transgênicas"). Algumas das sementes da progênie incluem outro DNA recombinante para conferir características adicionais (por exemplo, no caso de plantas transformadas, características que incluem resistência a herbicida, resistência a pragas, tolerância para germinação no frio, tolerância a falta de água e semelhantes). A partir dessas sementes de progênie, são selecionadas sementes transgênicas para serem cultivadas em uma primeira planta parental (que contém em seu genoma o constructo de DNA recombinante para esterilidade masculina induzível) e sementes transgênicas para serem cultivadas em uma segunda planta parental (que contém no seu genoma o constructo de DNA recombinante para esterilidade feminina induzível).

Um plantio misto é feito no campo, com uma proporção de semente transgênica de milho que tem o constructo para esterilidade masculina induzível para semente transgênica que tem o constructo para esterilidade masculina induzível entre cerca de 1:4 a cerca de 1:10. A semente transgênica de milho é deixada germinar, fornecendo dessa maneira a primeira planta parental com esterilidade masculina induzível (isto é, plantas parentais para ser polinizadas) e a segunda planta parental com esterilidade feminina induzível (isto é plantas parentais polinizadoras). No(s) estágio(s) apro-

priado(s) do desenvolvimento da planta, o herbicida glifosato é aplicado a primeira e a segunda plantas parentais por pulverização de uma quantidade eficaz para induzir esterilidade masculina nas primeiras plantas parentais e esterilidade feminina nas segundas plantas parentais. A semente coletada
 5 do campo é uma semente híbrida produzida a partir de óvulos da primeira planta parental polinizados pelo pólen da segunda planta parental.

Variações do procedimento acima são realizadas em milho, soja, algodão e trigo. Pares de constructos de DNA recombinante (cada par consistindo em um constructo de DNA recombinante para macho esterilidade
 10 induzível e um constructo de DNA recombinante para fêmea esterilidade induzível) são desenhados usando os padrões de expressão de miRNA específicos descritos na **Tabela 6** como se segue.

Cada constructo de DNA recombinante para macho esterilidade induzível inclui: (1) seqüência que transcreve RNA mensageiro que codifica
 15 uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, em que a proteína é selecionada a partir de uma 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, glifosato oxidoreductase, glifosato acetiltransferase, glifosato descarboxilase, *pat*, *bar*, dicamba monooxigenase, 2,2-ácido dicloropropiônico desalogenase, acetoidroxiácido sintase, acetolactato sintase, haloarilnitrilase, acetil-coenzima A carboxilase modificada, diidropteroato sintase, polipeptídeo de fotossistema II de 32 kDa, antranilato sintase, ácido dihidrodipicolínico sintase, fitoeno dessaturase, hidroxifenil piruvato dioxigenase, protoporfirinogênio oxidase I modificada, e ariloxialcanoato dioxigenase; e (2) se-
 20 qüência que transcreve pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente em tecido reprodutivo masculino, por exemplo, um miRNA maduro expresso em pólen selecionado a partir do grupo que consiste em UGACA-GAAGAGAGUGAGCAC (**SEQ ID NO. 323**), UGCCUGGCUCUCCU-
 25 GUAUGCCA (**SEQ ID NO. 328**), UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCU (**SEQ ID NO. 333**), e UUCCACAGCUUUCUUGAACUG (**SEQ ID NO. 338**) (vide **Tabela 6**). Dessa forma, exemplos não-limitantes de um constructo de DNA

recombinante para macho esterilidade induzível incluem: (1) seqüência que transcreve RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, e (2) seqüência que transcreve pelo menos um sítio e reconhecimento de miRNA exógeno que tem uma seqüência selecionada a partir do grupo de seqüências que consistem em GUGCUCUCUCU-
 5 CUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 324**), CUGCUCUCUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 325**), UUGCUUACUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 326**), CCGCUCUCUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 327**), UGGCAUGCAGGGAGCCAGGCA (**SEQ ID NO. 329**), AGGAAUACAGGGAGCCAGGCA (**SEQ ID NO. 330**),
 10 GGGUUUACAGGGAGCCAGGCA (**SEQ ID NO. 331**), AGGCAUACAGGAGCCAGGCA (**SEQ ID NO. 332**), AAACAAUGCGAUCCCUUUGGA (**SEQ ID NO. 334**), AGACCAUGCGAUCCCUUUGGA (**SEQ ID NO. 335**), GGU-CAGAGCGAUCCCUUUGGC (**SEQ ID NO. 336**), AGACAAUGCGAUCCCUUUGGA (**SEQ ID NO. 337**), UCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (**SEQ ID**
 15 **NO. 339**), CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (**SEQ ID NO. 340**), UCGUUC AAGAAAGCAUGUGGAA (**SEQ ID NO. 341**), ACGUUCAAGAAAGCUUGUGGAA (**SEQ ID NO. 342**), e CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGAA (**SEQ ID NO. 343**) (vide Tabela 6).

Similarmente, cada constructo de DNA recombinante para fêmea
 20 esterilidade induzível inclui: (1) seqüência que transcreve RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida, em que a proteína é selecionada a partir de uma 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, glifosato oxidoredutase, glifosato acetiltransfe-
 25 rase, glifosato descarboxilase, *pat*, *bar*, dicamba monooxygenase, 2,2-ácido dicloropropiônico desalogenase, acetoidroxiácido sintase, acetolactato sintase, haloarilnitrilase, acetil-coenzima A carboxilase modificada, diidropteroato sintase, polipeptídeo de fotossistema II de 32 kDa, antranilato sintase, ácido dihidrodipicolínico sintase, fitoeno dessaturase, hidroxifenil piruvato dioxigena-
 30 nase, protoporfirinogênio oxidase I modificada, e ariloxialcanoato dioxigenase; e (2) seqüência que transcreve pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso

especificamente em tecido reprodutivo feminino, por exemplo, um miRNA maduro selecionado a partir do grupo que consiste em UGACAGAAGAGA-GAGAGCACA (**SEQ ID NO. 297**), CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU (**SEQ ID NO. 302**), UCGGACCAGGCUUCAUUC CCC (**SEQ ID NO. 314**), UCG-
5 GACCAGGCUUCAUUC CCC (**SEQ ID NO. 314**), e UGAAGCUGCCAG-CAUGAUCUG (**SEQ ID NO. 319**) (vide **Tabela 6**). Dessa forma, exemplos não limitantes de um constructo de DNA recombinante para fêmea esterilidade induzível incluem: (1) seqüência que transcreve RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida e (2)
10 seqüência que transcreve pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno que tem uma seqüência selecionada a partir do grupo de seqüências que consistem em GUGCUCUCUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 298**), CUGCUCUCUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 299**), UUGCUUACUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 300**), CCGCUCUCUCUCUUCUGUCA (**SEQ ID NO. 301**), UGGAGCUCCCUUCAUUC CAAU (**SEQ ID NO. 303**), UCGA-
15 GUUCCCUUCAUUC CAAU (**SEQ ID NO. 304**), AUGAGCUCUCUUC AAC CAAA (**SEQ ID NO. 305**), UGGAGCUCCCUUCAUUC CAAAG (**SEQ ID NO. 306**), UAGAGCUUCCCUUC AAC CAAA (**SEQ ID NO. 307**), UGGAGCUC-CAUUCGAUCCAAA (**SEQ ID NO. 308**), AGCAGCUCCCUUC AAC CAAA
20 (**SEQ ID NO. 309**), CAGAGCUCCCUUCACUCCAAU (**SEQ ID NO. 310**), UGGAGCUCCCUUCACUCCAAU (**SEQ ID NO. 311**), UGGAGCUCCCUUCACUCCAAAG (**SEQ ID NO. 312**), UGGAGCUCCCUUUAUCCAAU (**SEQ ID NO. 313**), UUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 315**), CUGG-
GAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 316**), CUGGAAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 317**), CCGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 318**), UUGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 315**), CUGG-
25 GAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 316**), CUGGAAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 317**), CCGGGAUGAAGCCUGGUCCGG (**SEQ ID NO. 318**), GAGAUCAAGGCUGGCAGCUUGU (**SEQ ID NO. 320**), UAGAU-
30 CAGGCUGGCAGCUUGU (**SEQ ID NO. 321**), e AAGAUCAAGGCUGGCAGCUUGU (**SEQ ID NO. 322**) (vide **Tabela 6**).

Os dois membros de cada par de constructos de DNA recombi-

nantes são transformados individualmente em milho e soja e algodão e trigo, como descrito sob "Fazendo e Usando Células de Planta Transgênicas e Plantas Transgênicas". Plantas transgênicas de cada evento de inserção transgênico são cultivadas até a maturidade e sementes da progênie são produzidas por autopolinização ou cruzamento de rotina. Algumas das sementes da progênie incluem outro DNA recombinante para conferir características adicionais (por exemplo, no caso de plantas transformadas, características que incluem resistência a herbicida, resistência a pragas, tolerância a germinação no frio, tolerância a falta de água, e semelhantes). A partir dessas sementes de progênie são selecionadas sementes transgênicas para serem cultivadas em uma primeira planta parental (contendo no seu genoma constructo de DNA recombinante para macho esterilidade induzível) e semente transgênica para ser cultivada em uma segunda planta parental (contendo no seu genoma o constructo de DNA recombinante para fêmea esterilidade induzível). Um plantio misto é feito no campo, com uma proporção apropriada de sementes transgênicas que têm o constructo para macho esterilidade induzível em relação às sementes que tem o constructo para macho esterilidade induzível. A semente transgênica é deixada germinar, assim fornecendo primeiras plantas parentais com macho esterilidade induzível (isto é, polinizando plantas parentais). No(s) estágio(s) apropriado(s) de desenvolvimento da planta, o herbicida apropriado é aplicado às primeiras e segundas plantas parentais por pulverização de uma quantidade eficaz em induzir macho esterilidade nas primeiras plantas parentais e fêmea esterilidade nas segundas plantas parentais. Semente coletada do campo é semente híbrida produzida de óvulos da primeira planta parental polinizada por pólen da segunda planta parental.

Todos os materiais e métodos descritos e reivindicados aqui podem ser feitos e usados sem experimentação excessiva como instruído pela descrição acima. Embora os materiais e métodos dessa invenção tenham sido descritos em termos de modalidades preferidas e exemplos ilustrativos, será claro para aqueles versados na técnica que variações podem ser aplicadas aos materiais e métodos aqui descritos sem desconsiderar o conceito,

espírito e escopo da invenção. Todos os tais substitutos similares e modificações claras para os versados na técnica são considerados estar dentro do espírito, escopo e conceito da invenção como definido pelas reivindicações anexas.

<400>	20	
gugcucucuc ucuucuguca		20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	21	
cugcucucuc ucuucuguca		20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	22	
uugcuuacuc ucuucuguca		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	23	
cgcucucuc ucuucuguca		20
<210>	24	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	24	
uggagcucc uucauuccaa u		21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	25	
ucgaguucc uucauuccaa u		21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	26	
augagcucuc uucaaacc aa a		21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400> 27

uggagcuccc uucauuccaa g

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 28

uagagcuucc uucaaacc aa a

21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

uggagcucca uucgauccaa a

21

u

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

agcagcuccc uucaaacc aa a

21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Phaseolus vulgaris

<400> 31

cagagcuccc uucacuccaa u

21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> Vitis vinifera

<400> 32

uggagcuccc uucacuccaa u

21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 33

uggagcuccc uucacuccaa g

21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Oryza sativa

<400>	34	
uggagcuccc uuuaauccaa u		21
<210>	35	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	35	
uggcaugcag ggagccaggc a		21
<210>	36	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	36	
aggaauacag ggagccaggc a		21
<210>	37	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	37	
ggguuuacag ggagccaggc a		21
<210>	38	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	38	
aggcauacag ggagccaggc a		21
<210>	39	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Lotus corniculatus var. japonicus	
<400>	39	
aagcauacag ggagccaggc a		21
<210>	40	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	40	
accugaugua aucacuuuca a		21
<210>	41	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400>	41	
cccgaugua aucacuuuca g		21
<210>	42	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	42	
uuguuacuuu caaugcauug a		21
<210>	43	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	43	
cccgaugua uuuacuuuca a		21
<210>	44	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	44	
uagucacguu caaugcauug a		21
<210>	45	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	45	
cccgaugua uucacuuuca g		21
<210>	46	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	46	
cccgauguu guuacuuuca g		21
<210>	47	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	47	
uagucacuuu cagcgcauug a		21
<210>	48	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400>	48	
uccaaaugua gucacuuuca g		21
<210>	49	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	49	
uccaaaugua gucacuuuca a		21
<210>	50	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	50	
uccaaaugua gucacuuuca g		21
<210>	51	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	51	
uccaaaugua gucacuuuca a		21
<210>	52	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	52	
uuguaacuuu cagugcauug a		21
<210>	53	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	53	
uagucacguu caaugcauug a		21
<210>	54	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	54	
uuguuacuuu cagugcauug a		21
<210>	55	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	55	

cccugauguu gucacuuuca c	21
<210> 56	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 56	
uuguuacuua caaugcauug a	21
<210> 57	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 57	
uagucuuuuu caacgcauug a	21
<210> 58	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 58	
cuggaugcag agguauuauuc ga	22
<210> 59	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Populus tremula	
<400> 59	
cuggaugcag aggucuuauuc ga	22
<210> 60	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Oryza sativa	
<400> 60	
cuggaugcag agguuuuauuc ga	22
<210> 61	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 61	
aucgaguucc aaguccucuu caa	23
<210> 62	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 62	
aucgaguucc agguccucuu caa	23

<210>	63	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	63	
aucgaguucc aaguuuucuu caa		23
<210>	64	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	64	
agcacguacc cugcuucucc a		21
<210>	65	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	65	
uuuacgugcc cugcuucucc a		21
<210>	66	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	66	
agcacguguc cuguuucucc a		21
<210>	67	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	67	
ucuacgugcc cugcuucucc a		21
<210>	68	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	68	
cucacgugac cugcuucucc g		21
<210>	69	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	69	
cgcacgugac cugcuucucc a		21

<210>	70	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Medicago truncatula	
<400>	70	
cuuacguguc	cugcuucc	a 21
<210>	71	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	71	
cuuacgugcc	cugcuucc	a 21
<210>	72	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Lycopersicum esculentum	
<400>	72	
gccacgugca	cugcuucc	a 21
<210>	73	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	73	
uugggaugaa	gccugguccg	g 21
<210>	74	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	74	
cugggaugaa	gccugguccg	g 21
<210>	75	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	75	
cuggaaugaa	gccugguccg	g 21
<210>	76	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Populus tremula	
<400>	76	
ccgggaugaa	gccugguccg	g 21

<210>	77	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	77	
gagaucaggc uggcagcuug u		21
<210>	78	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	78	
uagaucaggc uggcagcuug u		21
<210>	79	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	79	
aagaucaggc uggcagcuug u		21
<210>	80	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	80	
uucccgagcu gcaucaagcu a		21
<210>	81	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	81	
aagggaaguc auccuuggcu g		21
<210>	82	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	82	
acgggaaguc auccuuggcu a		21
<210>	83	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	83	
aggggaaguc auccuuggcu a		21
<210>	84	
<211>	21	

<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	84	
aggcaauca ucuuuggcuc a		21
<210>	85	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	85	
gcggaauuc auucuuggcu u		21
<210>	86	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	86	
ccggcaauuc auucuuggcu u		21
<210>	87	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	87	
aagggaaguc auccuuggcu a		21
<210>	88	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Zea mays	
<400>	88	
guggcaacuc auccuuggcu c		21
<210>	89	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Vitis vinifera	
<400>	89	
ugggcaauuc auccuuggcu u		21
<210>	90	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	90	
auggcaauuc auccuuggcu u		21
<210>	91	
<211>	21	
<212>	RNA	

<213>	Glicina máxima	
<400>	91	
uaggaaguc auctuaggcu c		21
<210>	92	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Gossypium hirsutum	
<400>	92	
cugggaaguc auctuaggcu c		21
<210>	93	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	93	
gauauaggcg cggcucauc a		21
<210>	94	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	94	
cugcagcauc aucaggauuc u		21
<210>	95	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	95	
cagcagcauc aucaggauuc u		21
<210>	96	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	96	
augcagcauc aucaggauuc u		21
<210>	97	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	97	
uggcagcauc aucaggauuc u		21
<210>	98	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400>	98		
uuguagcauc aucaggauuc c			21
<210>	99		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<400>	99		
uugcagcauc aucaggauuc c			21
<210>	100		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<400>	100		
caggggggacc cuucagucca a			21
<210>	101		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<400>	101		
gaggggguccc cuucagucca u			21
<210>	102		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<400>	102		
gaggggguccc cuucagucca g			21
<210>	103		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<400>	103		
aagggguacc cuucagucca g			21
<210>	104		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<400>	104		
uaggggggacc cuucagucca a			21
<210>	105		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Oryza sativa		

<400>	105	
gaggggaccc cuucagucca g		21
<210>	106	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	106	
ucggggcaca cuucagucca a		21
<210>	107	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	107	
aaacaaugcg aucccuuugg a		21
<210>	108	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	108	
agaccaugcg aucccuuugg a		21
<210>	109	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	109	
ggucagagcg aucccuuugg c		21
<210>	110	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	110	
agacaaugcg aucccuuugg a		21
<210>	111	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	111	
ggagguugac agaauGCCaa a		21
<210>	112	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400>	112	
gaguuccucc aaacacuuca u		21
<210>	113	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	113	
gaguuccucc aaacacuuca u		21
<210>	114	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	114	
aaguucucc aaacacuuca a		21
<210>	115	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	115	
ucguucaaga aagccugugg aa		22
<210>	116	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	116	
ccguucaaga aagccugugg aa		22
<210>	117	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	117	
ucguucaaga aagcaugugg aa		22
<210>	118	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	118	
acguucaaga aagcuugugg aa		22
<210>	119	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400>	119	
ccguucaaga aagccugugg aa		22
<210>	120	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	120	
aaucaaugcu gcacucuaug a		21
<210>	121	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	121	
agucaacgcu gcacuuuaug a		21
<210>	122	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	122	
aaucaaugcu gcacuuuaug a		21
<210>	123	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	123	
aagggguuuc cugagaucac a		21
<210>	124	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	124	
ugcgggugac cugggaaaca ua		22
<210>	125	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	125	
aaggugugac cugagaauc ca		22
<210>	126	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	126	
gugauuuuuc ucaacaagcg aa		22

<210>	127	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	127	
gugauuuuuc ucuacaagcg aa		22
<210>	128	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	128	
gugauuuuuc ucuccaagcg aa		22
<210>	129	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	129	
uagggcauuu cuccuuuggc a		21
<210>	130	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	130	
uugggcaaa cuccuuuggc a		21
<210>	131	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	131	
ucgagcaaa cuccuuuggc a		21
<210>	132	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	132	
uagagcaaa cuccuuuggc a		21
<210>	133	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	133	
uagggcaaa cuccuuuggc a		21
<210>	134	
<211>	21	

<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	134	
uagggcaaaau cuccuuuggc a		21
<210>	135	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	135	
cugggcaaaau cuccuuuggc a		21
<210>	136	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	136	
ucgggcaaaau cuccuuuggc a		21
<210>	137	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	137	
ccgggcaaaau cuccuuuggc a		21
<210>	138	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Populus tremula	
<400>	138	
gcgggcaaaau cuccuuuggc a		21
<210>	139	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Medicago truncatula	
<400>	139	
aagggcaaaau cuccuuuggc a		21
<210>	140	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Triticum aestivum	
<400>	140	
uagggcaaaau cuccuuuggc g		21
<210>	141	
<211>	21	

<212> RNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 141

cugggcaaa cuccuuuggc g 21

<210> 142
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 142

uucggcaaa cuccuuuggc a 21

<210> 143
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Arabidopsis thaliana

h <400> 143

ggaguugug cgugaauca au 22

<210> 144
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 144

cuugucuauc ccuccugagc ua 22

<210> 145
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Sorghum bicolor

<400> 145

uauugucuauc ccuucugagc ug 22

<210> 146
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Saccharum officinarum

<400> 146

uauugucuauc ccuucugagc ua 22

<210> 147
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Zea mays

<400> 147

uauugucuauc ccuucugagc ug 22

<210> 148
 <211> 22

<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	148	
ucggucuauc	ccuccugagc	ug 22
<210>	149	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Pennisetum glaucum	
<400>	149	
uuagucuauc	ccuccugagc	ua 22
<210>	150	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Vitis vinifera	
<400>	150	
auugccuauc	ccuccugagc	ug 22
<210>	151	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Theobroma cacao	
<400>	151	
ccuugcuauc	ccuccugagc	ug 22
<210>	152	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Lycopersicum esculentum	
<400>	152	
cuugucuauc	ccuccugagc	ug 22
<210>	153	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Zea mays	
<400>	153	
cccuucuauc	ccuccugagc	ua 22
<210>	154	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Populus tremula	
<400>	154	
cuugucuauc	ccuccugagc	ua 22
<210>	155	
<211>	22	

<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	155	
cccuucuauc ccuccugagc ua		22
<210>	156	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Triticum aestivum	
<400>	156	
cccuucuauc ccuccugagc ua		22
<210>	157	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Hordeum vulgare	
<400>	157	
ccuuucuauc ccuccugagc ua		22
<210>	158	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Populus tremula	
<400>	158	
ccugucuauc ccuccugagc ua		22
<210>	159	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Mesembryanthemum crystallinum	
<400>	159	
ugugucuauc ccuccugagc ua		22
<210>	160	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	160	
ugacaaacau cucguccca a		21
<210>	161	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	161	
ugacaaacau cucguuccua a		21
<210>	162	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	

<400>	162	
ccaaggaag aggcagugca u		21
<210>	163	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	163	
accagugaag aggcugugca g		21
<210>	164	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	164	
gccaggaag aggcagugca u		21
<210>	165	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	165	
gccggugaag aggcugugca a		21
<210>	166	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	166	
gccggugaag aggcugugca g		21
<210>	167	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	167	
agggucuugc aaggucaaga a		21
<210>	168	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	168	
aaggucuugc aaggucaaga a		21
<210>	169	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	

<400>	169	
gaggucuugc aaggucaaga a		21
<210>	170	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	170	
acggucuugc aaggucaaga a		21
<210>	171	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	171	
agaacuagag aaagcauugg a		21
<210>	172	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	172	
agaguaagau ggagcuugau a		21
<210>	173	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	173	
agauggugga aaugggauau c		21
<210>	174	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	174	
uuguugaucg uaugguagaa g		21
<210>	175	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	175	
ggauuucgag uaucugcaaa a		21
<210>	176	
<211>	1242	
<212>	DNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	

<400> 176

acacgctgaa accatcttcc acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa 60
 cacaccataa cgcgcgcgcg cggtagaaga tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg 120
 ccaccgccgt cgctccgttc caggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtcgcccggc 180
 gctcctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcagggtg 240
 ggccggccta cggcaacaag aagttcgaga cgctgtcgta cctgccgcgc ctgtcgaccg 300
 gcgggcgcat ccgctgcatg caggccatgg ccttcttcaa ccgggtgatc accctcacgg 360
 tgccgtcgtc agacgtggtc aactactcgg agatctacca ggtggctcct cagtatgtca 420
 accaggccct gaccctggcc aagtacttcc agggcgccat cgacggcagc accctgaggt 480
 tcgacttcca gaaggcgta cagatcgcca acgacatccc gcaggccgcg gtggtcaaca 540
 ccctgaacca gaccgtccag caggggaccg tccaggtcag cgtcatgatc gacaagatcg 600
 tggacatcat gaagaatgtc ctgtccatcg tgatagacaa caagaagttt tgggatcagg 660
 tcacggctgc catcaccaac accttcacga acctgaacag ccaggagtcg gaggcctgga 720
 tcttctatta caaggaggac gccacaaga cgtcctacta ttacaacatc ctcttcgcca 780
 tccaggacga agagacgggt ggcgtgatgg ccacgctgcc catcgcttc gacatcagtg 840
 tggacatcga gaaggagaag gtctgttgcg tgaccatcaa ggacactgag aattacgccg 900
 tcaccgtcaa ggcgatcaac gtggtccagg cactccagtc tagcagggat tctaagggtg 960
 ttgatgcgtt caaatcgcca cggcacttac cccggaagag gcataagatt tgctctaact 1020
 cgtgatgact gctggatgca gaggtattat cgatgcgttt ggacgtatgc tcattcaggt 1080
 tggagccaat ttggttgatg tgtgtgcgag ttcttgcgag tctgatgaga catctctgta 1140
 ttgtgtttct tccccagtg tttctgtac ttgtgtaatc ggctaacgc caacagatc 1200
 ggcgatgaat aatgagaaa taaattgttc tgattttgag tg 1242

<210> 177
 <211> 956
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 177

acacgctgac aagctgactc tagcagatcc tctagaacca tcttcacac actcaagcca 60
 cactattgga gaacacacag ggacaacaca ccataagatc caagggaggc ctccgcccgc 120
 gccggtagaa gtgatcaacc atggccttct tcaaccgggt gatcaccctc acgggtgccg 180
 cgctcagacgt ggtcaactac tcggagatct accagggtgc tctcagtat gtcaaccagg 240
 ccctgaccct ggccaagtac ttccaggcg ccatcgacgg cagcaccctg aggttcgact 300
 tcgagaaggc gttacagatc gccaacgaca tcccgaggc cgcggtggtc aacaccctga 360

accagaccgt ccagcagggg accgtccagg tcagcgtcat gatcgacaag atcgtggaca 420
 tcatgaagaa tgtcctgtcc atcgtgatag acaacaagaa gttttgggat caggtcacgg 480
 ctgccatcac caacaccttc acgaacctga acagccagga gtcggaggcc tggatcttct 540
 attacaagga ggacgcccac aagacgtcct actattacaa catcctcttc gccatccagg 600
 acgaagagac ggggtggcgtg atggccacgc tgcccatcgc cttcgacatc agtgtggaca 660
 tcgagaagga gaaggtcctg ttcgtgacca tcaaggacac tgagaattac gccgtcaccg 720
 tcaaggcgat caacgtggtc caggcactcc agtctagcag ggattctaag gtggttgatg 780
 cgttcaaate gccacggcac ttaccccgga agaggcataa gatttgctct aactcgtgat 840
 gaatgtacgt gccctgcttc tccatctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcaggttgg 900
 agccaatttg gttgatgtgt gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgt 956

<210> 178
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 178

tgaagctgcc agcatgatct gg 22

<210> 179
 <211> 1683
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 179

atgtattgct gatgacgctg cgccttcttg tttttttgct gcaactttga gaaagataga 60
 tccatctgca tgcttttttc cgctgctatg gtgtatgggt gtgtgctgca gattttggat 120
 ctgacttggtg agaaccgtcg acggaccctt gcacacagta cgtgagacga tcgaggagga 180
 tggaggcacg cagtacgttt tgttctcgat ctctgctaca gcatgtcatc ttaattaagc 240
 ctactggttg catgcatggg tgaggattat tcatcgctaa gtttccatgt acgtagcata 300
 ctatcacatg tacaatgaaa taggcaaata gcctagacgt tcttctcatg acgaccatgt 360
 ctgccaatta aatatattgc aggtagtaaa cctcaagtac tgatagccat taattcttgg 420
 ttggagttcg acagagaaga tcgaaaagac atgtatagaa tactgatcgt ctgatcatat 480
 cgccctacc tatctgtctg tctctaccaa agtgggctac agtacgttag ctagctgtct 540
 cttcgaagac actgatagga tgtttgatta caagtccaac ggaaccactt gactgcatac 600
 ggttaccact tactcatgca agaaaaaaaa ttgcattttc aaattcgaac cccaagtcgt 660
 ctagtgtagg gtcttatggt cataaccagg tgggataaca aacatattaa tcgatctgca 720
 tatatatata tatacacaaa agggctacac agattacaga tgcagtgcac agaacctaat 780
 tgcagggtggg ggaccccggc cctccccggg tggacaataa aaaaaatcca gtttccaagc 840
 ccaagctata ggtaggcagt ccagagcggg ggtcttgtca ctttcttact tccaaaacca 900

ggccactggt gatgtaggct ggctggctgg ctcatgtgcc acagttgctg ttcgttatta 960
 actgtagtaa acatcagtgt ggacggggcg cagaatttca gatctcggta cgtatgctgt 1020
 gtggattcag cgttatttga acaccgtaat aatgctctcc agcagattgt gaattgtgaa 1080
 tacagttcgt agagâacact atttataatg cagacgttat gtttacatag tttagtttaa 1140
 aatgggagat aagatagaag agatagaatg agtaattggc tggagatcaa atcgtgcata 1200
 ttattgtgca aaacactggt tttccatata gtggagtttt aaagtatggg acgagagagc 1260
 agatagcaaa tcgtgtatat ggtcgtgcaa atattatata tgtggttggtg caaaactccg 1320
 aaatttgaaa taggagacac agttgataat tctacgtctc acgcacgggc ggcggtactgc 1380
 actactagtt catcggatgc gttacgtgc cactcctcat cttgtttcct tgtacgtact 1440
 agtgcaatcc gtcagccgca cggctccagt ccaactccagt ccagcaacag cgtcacctcc 1500
 agtccgaaa ggcttatcct tgcaacaaac atcgtacgaa aaaggcgag gacaaaagaa 1560
 aatggatcga aatgcaacaa ataaaaaagg gcatcaaat acgtgagag tgagcgagac 1620
 gttggcctcc ccatcccata tatatatagc tatagctatc cctcggttct tcaattcatt 1680
 cct 1683

<210> 180
 <211> 674
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 180

acgtatgctg tgtggattca gcgttatttg aacaccgtaa taatgctctc cagcagattg 60
 tgaattgtga atacagttcg tagagaacac tatttataat gcagacgtta tgtttacata 120
 gtttagttta aaatgggaga taagatagaa gagatagaat gagtaattgg ctggagatca 180
 aatcgtgcat attattgtgc aaaacactgt ttttccatat agtggagttt taaagtatgg 240
 gacgagagag cagatagcaa atcgtgtata tggctcgtgca aatattatat atgtggttgt 300
 gcaaaactcc gaaatttgaa ataggagaca cagttgataa ttctacgtc tacgcacggg 360
 cgggcgactg cactactagt tcatcggatg cgttacgtg ccaactcctca tcttggttcc 420
 ttgtacgtac tagtgcaatc cgtcagccgc acggctccag tccactccag tccagcaaca 480
 gcgtcacctc cagctccgaa aggcttatcc ttgcaacaaa catcgtacga aaaaggcgca 540
 ggacaaaaga aaatggatcg aaatgcaaca aataaaaaag ggcatacaaa tacgctgcga 600
 gtgagcgaga cgttggcctc cccatcccat atatatatag ctatagctat ccctcggttc 660
 ttcaattcat tcct 674

<210> 181
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 181

tgtctc

6

<210> 182

<211> 768

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 182

tcagcggttat ttgaacaccg taaagcctct ccggcagatt gtgaatacac agttgtggag 60
 aacgctatatt ataacgcaga cactatattat aatgcagatg tgtaaaagtg aaatttataa 120
 tagtagatga gataggagag atagaatgag taaactgctg gagagcaaatt cgtgcatatg 180
 atcgtgcaaa acaccgtttt tcgtagagtg aagtttataa tagcaggtga gagagtagat 240
 aggatgagta agctgatgga gagcaaatat tgtatatacg tggtcggtgc aatagagtga 300
 aatttgaaat aactgacaca gttttggtgc gtggaaatag acgaggataa ttctagtgc 360
 atccgcactg ccagtggacc ccgcccgcacg ataattctac gcacgggagg cgactgcac 420
 tactagttca tcgatcggat gcgttagcgt gccctcctc atattgtttc cttgtacgta 480
 ctagtgcatt ccgtcagccg cagggtcca gtccactcca gtccagcaac agcgtcacct 540
 ccagctccga aaggcttatt cttgcaacaa acatcgtacg aaaaaggcgc agggaaaarga 600
 aaagtgtcga aatacgacat aaaaaagca tcaaaatagc ctgagagtga gygagacatt 660
 ggctcccca tcccatatat atatagctat agctayccct cggttcttca attcatctat 720
 ccccgctct ctccatctct ctaccctttc tctctctcgg atagctag 768

<210> 183

<211> 407

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 183

tttgaaataa ctgacacagt tttggtgcgt ggaaatagac gaggataatt ctagtgcatt 60
 ccgcactgcc agtggacccc gccgcagat aattctacgc acgggaggcg cactgcacta 120
 ctagttcatc gatcggatgc gttagcgtgc ccctcctcat attgtttcct tgtacgtact 180
 agtgcaatcc gtcagccgca cggctccagt ccactccagt ccagcaacag cgtcacctcc 240
 agctccgaaa ggcttattct tgcaacaaac atcgtacgaa aaaggcgcag gaaaargaaa 300
 agtgtcgaaa tacgacataa aaaaagcatc aaaatagcgt gcgagtgagy gagacattgg 360
 cctcccatc ccatatatat atagctatag ctayccctcg gttcttc 407

<210> 184

<211> 21

<212> RNA

<213> Glicina máxima

<400> 184

ugagaccaaa ugagcagcug a

21

<210> 185
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 185

gcugcucauc uguucucagg

20

<210> 186
 <211> 762
 <212> DNA
 <213> Glicina máxima

<400> 186

aaaattcatt acattgataa aacacaattc aaaagatcaa tgttcactt catgcaaaga 60

catttccaaa atatgtgtag gtagaggggt tttacaggat cgtcctgaga ccaaattgagc 120

agctgaccac atgatgcagc tatgtttgct attcagctgc tcatctgttc tcaggctgcc 180

cttggtggac tgtccaactc ctactgattg cggatgcact tgccacaaat gaaaatcaaa 240

gcgaggggaa aagaatgtag agtgtgacta cgattgcatg catgtgattt aggttaattaa 300

gttacatgat tgtctaattg tgtttatgga attgtatatt ttcagaccag gcacctgtaa 360

ctaattatag gtaccatacc ttaaaataag tccaactaag tccatgtctg tgatttttta 420

gtgtcacaaa tcacaatcca ttgccattgg ttttttaatt tttcattgtc tgttggttaa 480

ctaactctag ctttttagct gtttcaagta cagattcctc aaagtggaaa atgttctttg 540

aagtcaataa aaagagcttt gatgatcatc tgcattgtct aagttggata aactaattag 600

agagaacttt tgaactttgt ctaccaaata tctgtcagtg tcatctgtca gttctgcaag 660

ctgaagtgtt gaatccacga ggtgcttgtt gcaaagttgt gatattaaaa gacatctacg 720

aagaagttca agcaaaactc tttttggcaa aaaaaaaaaa aa 762

<210> 187
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 187

uagaagcucc ccauguucuc a

21

<210> 188
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 188

gagcaugggu aacuucua

19

<210> 189
 <211> 346
 <212> DNA
 <213> Glicina máxima

<220>
 <221> incerto
 <222> (1)..(346)
 <223> incerto em todas locações n

<400> 189

ttttctccta actttgagag catgggtaac ttctatTTTT atctctgncc ccntttcctt 60
 catcttttct tcaaccttta ttogttcctt tttcaactgt taaaaggcct gactatgttg 120
 aggaaattaa gaaaatgggt ttgttgccga tgccagcaga atagaagctc cccatgttct 180
 caccgttagc agaaaacggg tgttatcttg ataagaccgc caggttccat tcccttgttt 240
 gccagcacca ccatcacttc ttcactctag tatccgattt ttttaaagga tcgttggtccc 300
 ttgccttctg gtggacttct atggagaagt ttcttcacac cctatg 346

<210> 190
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 190

uguugcgggu aucuuugccu c 21

<210> 191
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 191

ggcguagauc cccacaacag 20

<210> 192
 <211> 434
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 192

aacacuaggg uuugcauucc uccuuuagcc gcaacccaaua uucuaagcuu ccuuucuccu 60
 acuguucugu gucgggccag caaaacuguu gcgguauau uugccucuga aggaaaguug 120
 ugccuauuau uauggcuuau ugcuuuagug gcuagaucc ccacaacagu uaugcuugca 180
 cugccuuuug ucuccgagac uaacaaaauu gauuguaugu ucucuuguug cuaaacuuuu 240
 gauuuugacc cgaacugcau gaggcaugaa aguuucauag ugguucaacc acaguaaaau 300
 aggaugguca guuuauugcu ggguuuuaua agaauuuuuu gaucugucuu gauuacugga 360
 ccuauuggaug aacacccugu ugguguugaa aaaguagcuu cagccuucug gaugugguaa 420
 ugagcuuucg augc 434

<210> 193
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 193

ugcgaguguc uucgccucug a 21

<210> 194
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 194

ggaggcguag auacucacac c 21

<210> 195
 <211> 439
 <212> DNA
 <213> Glicina máxima

<400> 195

aattagggtt ctctggtcct cccgcccccg gtgctggcat tctcaagcca gtgaaatcgg 60
 tgcgagtgtc ttgcctctg agagagatac tatgagatct caagcctcgg aggcgtagat 120
 actcacacct ctttttctgg ctatctcacc actgctcttt tccgccgggg cacgaaggtc 180
 cttgcctca ccaaatttcg ttctttaaat ttcacctata tatgtgtata tttttaataa 240
 taataattag gtttaaaggg aaaaaaagtc gcttcttaat cctttattca ttgtatgcag 300
 aacgatttga ttcgtgatga taatgtatgg atctgtatag tcggttgctc tagtatccaa 360
 taatttgatt tctaacaaat taatatgtag tggccttctt ggacatgaaa aaaattcttg 420
 aaattgggtt gttagggtta 439

<210> 196
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 196

uugccgauuc cacccauucc ua 22

<210> 197
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 197

gcugcucauc uguucucagg 20

<210> 198
 <211> 495
 <212> DNA

<213> Glicina máxima

<400> 198

gactagatgt gaatgtgatt catattcata gagagagaaa gggaaaggga gaagagcttg 60
 aggaagtgat gggagatggg agggtcggta aagaatatat ctgagactcg actcaatctc 120
 gatctctctc agtgttgtgt tgttttggtt atccttttgc cgattccacc cattcctatg 180
 atttccttcg gttcctctct ttccactctc ctctccgctc tttcctcttg ttatggtaag 240
 cacctttctt cttcagatct gctctttata ccatacactt attatagatc taagttttta 300
 tggaccttaa ctatcttctt tgatctctta ttaattttta ccgctctctc tttgttgctg 360
 gacatgttac ttcaagataa caaattgctt ttttattttt catcttttct ctcgttctct 420
 tgtttaaggt ttctataaat catcgatgag atacctataa taatatactt attacagaca 480
 aaaaaaaaaa aaaaaa 495

<210> 199

<211> 825

<212> DNA

<213> Glicina máxima

<400> 199

ctgttctata ttgatagagt gagaaaggga aaggaagaag agcttgagga agtgatggga 60
 gatgggaggg tcggtaaagg ataacagcgt ctctatgatt aattggttg tggtttatct 120
 ttttgccgat tccaccatt cctatgattt tctttgggtc ctttctttcc actctctct 180
 ccgctctcca caatctgtta tggatcatgaa gctgccggtc tgactgggtt acattcaaga 240
 caagaaaaaa caacaaatcg cttctttctt ttttctctt ttctttcctt tttcttggtt 300
 aaggcttaac aaattatctc agctctagta gatgtagatt attacagaca gatgctagtt 360
 aattagctag ctccacaaga tgtttaaaaa tgtgatctat ccatatcaag ctggaccaaa 420
 tccaaataat tttactggag cttttctttc ttggtaaaag ctggacattt ttaaagggtt 480
 ggggtgccact ataacgccac caaagttttc tttcttgatt ttaaccaag ttacattttt 540
 ttccctaaat tattccagcg ctaataaata ctgaattttc tgtttttttt ataaaaagaa 600
 ttttacatta aattctttga aaataatttc attttggttg ttaatatatt tttttagttc 660
 ataacaaatt aacgaatttt gtatttattt tttataaaa aattattaga aaataacata 720
 ttaaatacaag caaaaaaatg tattttatta aaataaaaaa gtgaaggaaa aaattattta 780
 aaaccaacac accaacadat ttttaacttt ttattaaact aaacg 825

<210> 200

<211> 21

<212> RNA

<213> Glicina máxima

<400> 200

ccagcugcuc auuuggucac u

<210>	201	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	201	
agaggacaug gggagguucu a		21
<210>	202	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	202	
ucagcugcuc aucuguucuc a		21
<210>	203	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	203	
ccagcugcuc auuuggucac u		21
<210>	204	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	204	
ucagcucuuc uuuuggucuc u		21
<210>	205	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	205	
ucagcuacug aucuggucuc a		21
<210>	206	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	206	
ucagcuguuc cuuuguucuc u		21
<210>	207	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	207	
ucagcuguuc cuuuguucuc u		21

<210> 208
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 208

guagcuucuc acuuggucuu a 21

<210> 209
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 209

uuagcugcuu cuucggucuc u 21

<210> 210
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 210

uuagaugcuu guuuggucuu u 21

<210> 211
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 211

ugagaacaug gggagccucu a 21

<210> 212
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 212

agaggacaug gggagauucu a 21

<210> 213
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 213

agaggacaug gggagguucu a 21

<210> 214
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 214

ugagaacaug ggaauucu a 21

<210> 215
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 215

aaagaacaug gggagccucu a 21

<210> 216
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 216

ugagaacaug ggggauuucu a 21

<210> 217
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 217

ugugaaggug gggagcuucu u 21

<210> 218
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 218

ggagaacaug cagagcuucu g 21

<210> 219
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 219

ugagaaacug gggagcuuuu c 21

<210> 220
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 220

ugagaacugg ugagcuucug 20

<210> 221
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 221

ugaguacugg ggagcuucuc 20

<210> 222
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 222

ugagagcaug gguaacuucu a 21

<210> 223
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 223

ugagcacugg ggagcuucuc 20

<210> 224
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 224

ugagcacugg ggagcuucuc 20

<210> 225
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 225

ugagcacugg ggagcuucuc 20

<210> 226
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 226

ugagaacaug ggaacuucu a 21

<210> 227
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 227

ugagagcaug gguaacuucu a 21

<210> 228
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 228

ugagaaccug guaagcuucu g 21

<210>	229	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	229	
ugagaacauc gaaagcuucu u		21
<210>	230	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	230	
ugaggacaag gggagcuuau g		21
<210>	231	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	231	
cuaaaacaug gggagcuucu u		21
<210>	232	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	232	
ugaggaaaaua gggaguuucu g		21
<210>	233	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	233	
ugagaacaua gugaguuuuu u		21
<210>	234	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	234	
uaggaucgug gggagcuucu c		21
<210>	235	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	235	
uaggaucgug gggagcuucu c		21

<210> 236
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 236

uaggaucgug gggagcuucu c

21

<210> 237
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 237

gaugaaauaug gggaguuucu a

21

<210> 238
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 238

ggggcaagga cauccgcaac g

21

<210> 239
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 239

aaggcaaagu ugcccgcgac g

21

<210> 240
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 240

gaggcaaaga ugcgagcaac g

21

<210> 241
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 241

gcggaaga uacucacaac c

21

<210> 242
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 242

aacgcaaaga gaccuguaac a

21

<210> 243
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 243

aaggcaaaga ugccagcgac g 21

<210> 244
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 244

gagccaaaga gacccgugac g 21

<210> 245
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 245

aaggcauaga uagucgcagc a 21

<210> 246
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 246

aaggcaaaga ugccagcaau g 21

<210> 247
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 247

uagggaaaga uacauguaac a 21

<210> 248
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 248

gaggcaaagu uguucgcaau g 21

<210> 249
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 249

caggcaaaga ugucugcaau u 21

<210> 250
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 250

uagguaugga uacuugcaac a 21

<210> 251
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 251

aaggcaaagc ugcccgcgau g 21

<210> 252
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 252

ucaggggagg agacacucgc a 21

<210> 253
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 253

uuagaggcaa agacacucgu c 21

<210> 254
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 254

ucagaggaga agauacucgu g 21

<210> 255
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 255

ucagaggaga agacacgcgc a 21

<210> 256
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 256

ucagagggga agacacgcgc u 21

<210> 257
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 257

ucagagggga agacacacgc u 21

<210> 258
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 258

ucagagguga ggacacacgc u 21

<210> 259
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 259

ccagaggcgg augcauucgc a 21

<210> 260
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 260

acagaggcag ggacacuugc a 21

<210> 261
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 261

gcagagguga agaagcuugc a 21

<210> 262
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 262

uuagaggaga ggauacucgc g 21

<210> 263
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 263

gcagagguga agaagcuugc a 21

<210> 264

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 264

ucagaggcaa agauacccgc a

21

<210> 265
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 265

uuagagggga agacacgcgc u

21

<210> 266
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 266

ucagagggga agacacccgu g

21

<210> 267
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 267

ucagaggcua agagacuugu a

21

<210> 268
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 268

ucagagggga agacacgcgc g

21

<210> 269
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 269

ucagagggga agacacccgu g

21

<210> 270
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 270

ucagagggga agacacacgu u 21

<210> 271
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 271

ucagagggga agacacacgu u 21

<210> 272
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 272

ucagggguga agacacacgu a 21

<210> 273
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 273

ucagagggga agacacccgu g 21

<210> 274
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 274

ucagaaacga agacgcucgu u 21

<210> 275
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 275

uccgagggga agauacucgu u 21

<210> 276
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 276

uccgagggga agauacucgu c 21

<210> 277

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 277

uccgagggga agauacucgu c 21

<210> 278
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 278

gcagaggcug uggcacucgc a 21

<210> 279
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 279

uuagaggcga ggacacacgu u 21

<210> 280
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 280

uccgaggaga agauacucgu u 21

<210> 281
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 281

ucaguggcga aggcguucgu c 21

<210> 282
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 282

uuagagguga uggcacucgu g 21

<210> 283
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 283

ggggaauaggg uggaacggc aa 22

<210> 284

<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	284	
ugggaauggg	ugggaugggu aa	22
<210>	285	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	285	
ugggaauggg	ugggaugggu aa	22
<210>	286	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	286	
auggaacugg	uggaaugggc aa	22
<210>	287	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	287	
cgggaaaggu	uggaaugggc aa	22
<210>	288	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	288	
uaggaauggg	uggauuuugc aa	22
<210>	289	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	289	
ggaaugggug	gcgugggcaa	20
<210>	290	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Glicina máxima	
<400>	290	
caggaaagg	gggaguuggc aa	22
<210>	291	
<211>	22	

<212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 291

uagcaauggg uuggaucggu ga 22

<210> 292
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 292

guugaauggg uggaauugga aa 22

<210> 293
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 293

guugaauggg uggaauugga aa 22

<210> 294
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 294

aaggaauugg gggaauggu ac 22

<210> 295
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 295

cacgaguggg gggaaucggc gg 22

<210> 296
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Glicina máxima

<400> 296

guggaauggg uggucuuggu aa 22

<210> 297
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Zea mays

<400> 297

ugacagaaga gagagagcac a 21

<210> 298
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 298

gugcucucuc ucuucuguca 20

<210> 299
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 299

cugcucucuc ucuucuguca 20

<210> 300
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 300

uugcuuacuc ucuucuguca 20

<210> 301
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 301

ccgcucucuc ucuucuguca 20

<210> 302
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Zea mays

<400> 302

cuuggauuga agggagcucc u 21

<210> 303
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>

<223>	Constructo sintético	
<400>	303	
	uggagcuccc uucauuccaa u	21
<210>	304	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	304	
	ucgaguuccc uucauuccaa u	21
<210>	305	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	305	
	augagcucuc uucaaacc aa a	21
<210>	306	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	306	
	uggagcuccc uucauuccaa g	21
<210>	307	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	307	
	uagagcuucc uucaaacc aa a	21
<210>	308	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	308	

uggagcucca uucgaucacaa a 21

<210> 309
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 309

agcagcuccc uucaaacacaa a 21

<210> 310
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 310

cagagcuccc uucacuccaa u 21

<210> 311
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 311

uggagcuccc uucacuccaa u 21

<210> 312
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 312

uggagcuccc uucacuccaa g 21

<210> 313
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 313

uggagcuccc uuuaaucacaa u 21

<210>	314	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Zea mays	
<400>	314	
ucggaccagg	cucauuccc c	21
<210>	315	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	315	
uugggaugaa	gccugguccg g	21
<210>	316	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	316	
cugggaugaa	gccugguccg g	21
<210>	317	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	317	
cuggaaugaa	gccugguccg g	21
<210>	318	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	318	
ccgggaugaa	gccugguccg g	21
<210>	319	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Zea mays	
<400>	319	
ugaagcugcc	agcaugaucu g	21
<210>	320	

<211> 21
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 320

gagaucaggc uggcagcuug u 21

<210> 321
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 321

uagaucaggc uggcagcuug u 21

<210> 322
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 322

aagaucaggc uggcagcuug u 21

<210> 323
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Zea mays

<400> 323

ugacagaaga gagugagcac 20

<210> 324
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 324

gugcucucuc ucuucuguca 20

<210> 325
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400>	325	
cugcucucuc	ucuucuguca	20
<210>	326	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	326	
uugcuuacuc	ucuucuguca	20
<210>	327	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	327	
ccgcucucuc	ucuucuguca	20
<210>	328	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Zea mays	
<400>	328	
ugccuggcuc	ccguaugcc a	21
<210>	329	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	329	
uggcaugcag	ggagccaggc a	21
<210>	330	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	330	
aggaauacag	ggagccaggc a	21
<210>	331	
<211>	21	

<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	331	
ggguuuacag ggagccaggc a		21
<210>	332	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	332	
aggcauacag ggagccaggc a		21
<210>	333	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Zea mays	
<400>	333	
uccaaagga ucgcaugau cu		22
<210>	334	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	334	
aaacaaugcg aucccuuugg a		21
<210>	335	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	335	
agaccaugcg aucccuuugg a		21
<210>	336	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	seqüência artificial	
<220>		
<223>	Constructo sintético	
<400>	336	
ggucagagcg aucccuuugg c		21

<210> 337
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 337

agacaaugcg aucccuuugg a

21

<210> 338
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Zea mays

<400> 338

uuccacagcu uucuugaacu g

21

<210> 339
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 339

ucguucaaga aagccugugg aa

22

<210> 340
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 340

ccguucaaga aagccugugg aa

22

<210> 341
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 341

ucguucaaga aagcaugugg aa

22

<210> 342
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> seqüência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 342

acguucaaga aagcuugugg aa

22

<210> 343
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 343

ccguucaaga aagccugugg aa

22

<210> 344
 <211> 1368
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 344

atgcttcacg gtgcaagcag ccgtccagca actgctcgta agtcctctgg tctttctgga 60
 accgtccgta ttccagggtga caagtctatc tcccacaggt ccttcattgtt tggagggtctc 120
 gctagcgggtg aaactcgtat caccgggtctt ttggaagggtg aagatgttat caacactgggt 180
 aaggctatgc aagctatggg tgccagaatc cgtaaggaag gtgatacttg gatcattgat 240
 ggtgttggtg acggtggact ccttgctcct gaggtctctc tcgatttcgg taacgctgca 300
 actggttgcc gtttgactat gggctctgtt ggtgtttacg atttcgatag cactttcatt 360
 ggtgacgctt ctctcactaa gcgtccaatg ggtcgtgtgt tgaaccact tcgcgaaatg 420
 ggtgtgcagg tgaagtctga agacgggtgat cgtcttcag ttaccttgcg tggaccaaag 480
 actccaacgc caatcaccta cagggtacct atggcttccg ctcaagtga gtcgctgtt 540
 ctgcttgctg gtctcaacac ccagggtatc accactgtta tcgagccaat catgactcgt 600
 gaccacactg aaaagatgct tcaagggtttt ggtgctaacc ttaccgttga gactgatgct 660
 gacgggtgtg gtaccatccg tcttgaagggt cgtggtaagc tcaccgggtca agtgattgat 720
 gttccagggtg atccatctc tactgctttc ccattgggtg ctgccttgct tgttccagggt 780
 tccgacgtca ccattcctta cgttttgatg aaccaaccc gtactgggtct catcttgact 840
 ctgcaggaaa tgggtgccga catcgaagt atcaaccac gtcttgctgg tggagaagac 900
 gtggctgact tgcgtgttcg ttcttctact ttgaagggtg ttactgttcc agaagaccgt 960
 gtccttctta tgatcgacga gtatccaatt ctgctgttg cagctgcatt cgctgaagggt 1020
 gctaccgtta tgaacgggtt ggaagaactc cgtgttaagg aaagcgaccg tctttctgct 1080
 gtgcgaaacg gtctcaagct caacgggtgtt gattgcatg aagggtgagac ttctctcgtc 1140
 gtgcgtgggtc gtctgacgg taagggtctc ggtaacgctt ctggagcagc tgtcgtacc 1200
 cactcgatc accgtatcgc tatgagcttc ctggttatgg gtctcgtttc tgaaaaccct 1260
 gttactgttg atgatgctac tatgatcgt actagcttcc cagagttcat ggatttgatg 1320

gctggtcttg gagctaagat cgaactctcc gacactaagg ctgcttga 1368

<210> 345
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 345

tgagctcaag aattcgagct cggtagcgga tcctctagct ag 42

<210> 346
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 346

tgagctcaag aattcgaaga caatgcgatc ccuuggagc tcggtaccgg atcctctagc 60

tag 63

<210> 347
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 347

tgagctcaag aattcgatcc gctttctctc ttctgtcagc tcggtaccgg atcctctagc 60

tag 63

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma semente híbrida não-natural, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) fornecer uma primeira planta parental transgênica, indutivamente estéril, contendo no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA compreendendo:

10 (i) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente no tecido reprodutivo da dita primeira planta parental; e

(ii) um primeiro RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um primeiro herbicida;

15 em que o dito miRNA maduro suprime especificamente a expressão da dita proteína no dito tecido reprodutivo, e

em que a esterilidade da dita primeira planta parental é induzível pela aplicação do dito primeiro herbicida a dita primeira planta parental;

e

20 (b) cruzar a dita primeira planta parental com uma segunda planta parental sob condições onde a esterilidade tenha sido induzida na dita primeira planta parental, assim produzindo uma semente híbrida não natural.

25 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito sítio de reconhecimento de miRNA exógeno está localizado dentro de pelo menos um de:

(a) uma região a 5' da sequência codificante do dito primeiro RNA mensageiro;

(b) uma região a 3' da sequência codificante do dito primeiro RNA mensageiro; e

30 (c) o dito primeiro RNA mensageiro.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito miRNA maduro é pelo menos um selecionado a partir dos

miRNAs identificados nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, e 6.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito constructo de DNA recombinante ainda compreende pelo menos um elemento selecionado a partir de:

- 5 (a) um promotor de planta;
- (b) um elemento de supressão gênica;
- (c) um íntron;
- (d) um elemento de expressão gênica;
- 10 (e) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante;
- (f) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante e DNA que transcreve para um RNA regulatório capaz de regular a expressão de uma sequência alvo, caracterizado pelo fato de que a dita regulação é dependente da conformação do dito RNA regulatório, e a dita conformação do dito RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do dito aptâmero de RNA; e
- 15 (g) pelo menos uma borda de T-DNA.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
20 fato de que a segunda planta parental é tolerante ao dito primeiro herbicida.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro herbicida é um herbicida sistêmico.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita proteína que confere tolerância é pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, glifosato oxidoredutase, glifosato acetiltransferase, glifosato descarboxilase, *pat*, *bar*, dicamba monooxigenase, ácido 2,2-dicloropropiônico desalogenase, acetoidroxiácido sintase, acetolactato sintase, haloarilnitrilase, acetil-coenzima A carboxilase modificada, diidropteroato
25 sintase, polipeptídeo de fotossistema II de 32 kDa, antranilato sintase, ácido dihidrodipicolínico sintase, fitoeno desaturase, hidroxifenil piruvato dioxigena-

se, oxidase de protoporfirinogênio I modificada, e ariloxialcanoato dioxigenase.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

- 5 (a) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a dita primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a dita segunda planta parental é normalmente fértil; ou
- (b) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a dita primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a dita segunda planta parental é fêmea-estéril; ou
- 10 (c) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a dita primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a dita segunda planta parental é indutivamente fêmea-estéril; ou
- 15 (d) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a dita primeira planta parental é indutivamente fêmea-estéril, e a dita segunda planta parental é normalmente fértil; ou
- (e) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a dita primeira planta parental é indutivamente fêmea-estéril, e a dita segunda planta parental é macho-estéril; ou
- 20 (f) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a dita primeira planta parental é indutivamente fêmea-estéril, e a dita segunda planta parental é indutivamente macho-estéril.

25 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

- (a) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino, a dita primeira planta parental é indutivamente macho-estéril, e a dita segunda planta parental compreende uma segunda
- 30 planta parental transgênica, indutivamente fêmea-estéril que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA compreendendo: (i) pelo me-

5 nos um sitio de reconhecimento de miRNA exógeno reco-
nhecível por um segundo miRNA maduro que é expresso
especificamente no tecido reprodutivo feminino da dita se-
gunda planta parental, e (ii) um segundo RNA mensageiro
que codifica uma segunda proteína que confere tolerância
a um segundo herbicida; em que o dito segundo miRNA
maduro suprime especificamente a expressão da dita se-
gunda proteína no dito tecido reprodutivo feminino, e em
que a fêmea esterilidade da dita segunda planta parental é
10 induzível pela aplicação do dito segundo herbicida a dita
segunda planta parental; ou

(b) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino, a
dita primeira planta parental é indutivamente fêmea estéril,
e a dita segunda planta parental compreende uma segunda
15 planta parental transgênica, indutivamente macho-estéril
contendo no seu genoma um constructo de DNA recombi-
nante que transcreve RNA que compreende: (i) pelo menos
um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecí-
vel por um segundo miRNA maduro que é expresso espe-
cificamente no tecido reprodutivo masculino da segunda
20 planta parental, e (ii) um segundo RNA mensageiro que
codifica uma segunda proteína que confere tolerância a um
segundo herbicida; em que o dito segundo miRNA maduro
suprime especificamente a expressão da dita segunda pro-
teína no dito tecido reprodutivo masculino, e em que a ma-
cho esterilidade da dita segunda planta parental é induzível
25 pela aplicação do dito segundo herbicida a dita segunda
planta parental.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo
30 fato de que o dito herbicida e a dito segundo herbicida:

- (a) são idênticos; ou
- (b) são diferentes.

11. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre o dito primeiro herbicida e o dito segundo herbicida compreende um herbicida sistêmico.

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo
5 fato de que pelo menos um entre o dito primeiro herbicida e o dito segundo herbicida compreende pelo menos um herbicida selecionado a partir do grupo que consiste em glifosato, dicamba, glufosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinil, ácido 2,2-dicloropropiônico, inibidores de acetolactato sintase, cicloezanodiona, ariloxifenoxipropionato, herbicidas de sulfonamida,
10 herbicidas de triazina, 5-metiltroptofano, aminoetil cisteína, herbicidas de piridazinona, herbicidas de ciclopropilisoxazol, inibidores de protoporfirino-gênio, e herbicidas contendo uma porção ariloxialcanoato.

13. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro e o dito segundo RNAs mensageiros:

- 15 (a) são idênticos, ou
(b) são diferentes.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita semente híbrida não-natural é semente de milho.

15. Semente híbrida não-natural, caracterizada pelo fato de que
20 é produzida usando atividade humana que compreende o método da reivindicação 3.

16. Planta transgênica, indutivamente estéril, caracterizado pelo fato de que contém no seu genoma um constructo de DNA recombinante que transcreve RNA que compreende:

- 25 (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente no tecido reprodutivo da dita planta; e
(b) RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida;

30 em que o dito miRNA maduro suprime especificamente a expressão da dita proteína no tido tecido reprodutivo,
em que a esterilidade da dita planta transgênica é induzível pela

aplicação do dito herbicida a dita planta.

17. Planta transgênica, indutivamente estéril de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que:

- 5 (a) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo masculino e a dita esterilidade é macho esterilidade; ou
- (b) o dito tecido reprodutivo é tecido reprodutivo feminino e a dita esterilidade é fêmea esterilidade.

18. Planta transgênica, indutivamente estéril de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o dito tecido reprodutivo
10 compreende um óvulo fertilizado, e a dita esterilidade resulta na falha do óvulo fertilizado desenvolver uma semente viável.

19. Planta transgênica, indutivamente estéril de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a dita planta é planta de cultivo propagada por semente.

15 20. Planta transgênica, indutivamente estéril de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a dita planta é selecionada a partir de milho, arroz, trigo, aveia, cevada, centeio, triticale, painço, sorgo, quinoa, amaranto, trigo sarraceno, gramas de forragem, gramas de turfa, alfafa, algodão, açafroa, girassol, soja, canola, colza, linho, amendoim, feijão, ervilhas, lentilhas, alfafa, alface, aspargo, alcachofra, aipo, cenoura, rabanete, repolho, couve galega, mostarda, brócolis, couve-flor, couve de Bruxelas, nabo, couve-rábano, pepino, melões, abóboras, abóboras, cebolas,
20 alho, alho poró, chalota, cebolinha, tomates, berinjelas, pimentas, fisális, beterraba, acelga, espinafre, plantas ornamentais, e árvores florestais.

25 21. Constructo de DNA recombinante que transcreve RNA caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno reconhecível por um miRNA maduro que é expresso especificamente no tecido reprodutivo de uma planta; e
- 30 (b) um RNA mensageiro que codifica uma proteína que confere tolerância a um herbicida.

22. Constructo de DNA recombinante da reivindicação 21, carac-

terizado pelo fato de que o dito pelo menos um sítio de reconhecimento de miRNA exógeno está localizado dentro de pelo menos um de:

- (a) uma região a 5' da seqüência codificante do dito primeiro RNA mensageiro;
- 5 (b) uma região a 3' da seqüência codificante do dito primeiro RNA mensageiro; e
- (c) o dito primeiro RNA mensageiro.

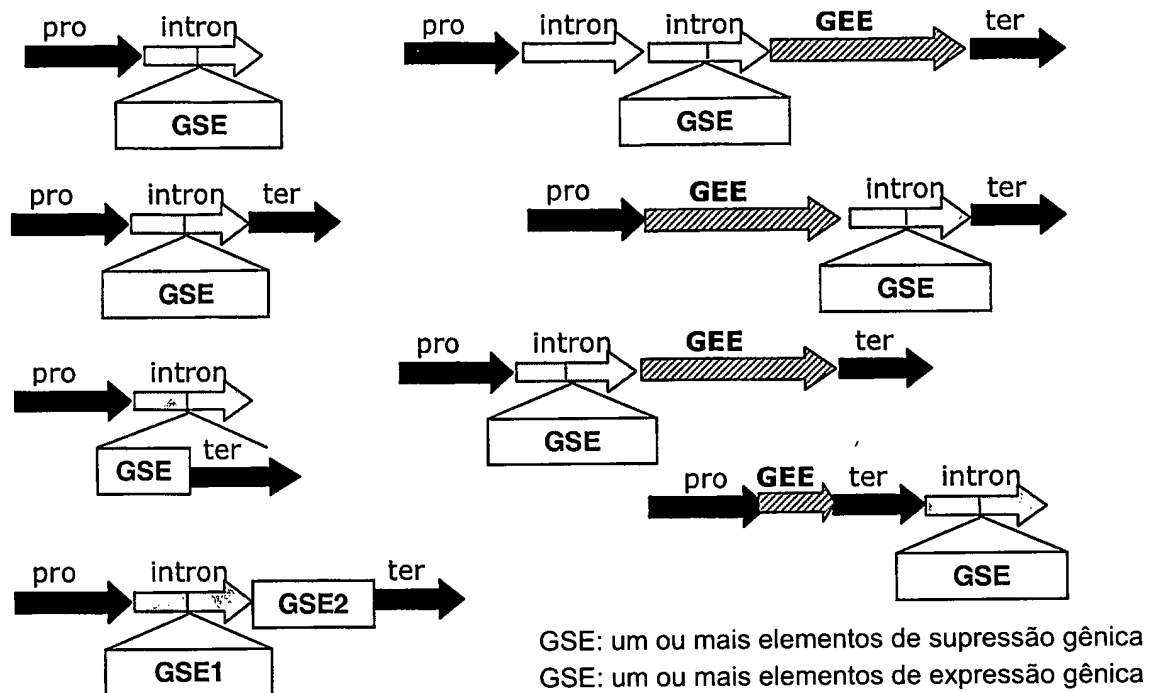
23. Constructo de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito miRNA maduro é pelo menos um selecionado a partir dos miRNAs identificados nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, e 6.

24. Constructo de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 21, em que o dito constructo de DNA recombinante ainda compreende pelo menos um elemento selecionado a partir de:

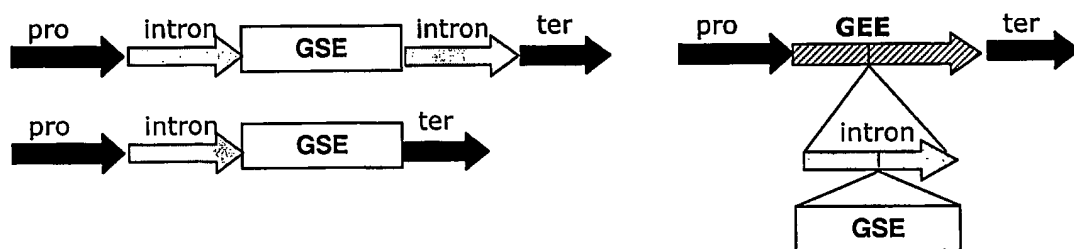
- 15 (a) um promotor de planta;
- (b) um elemento de supressão gênica;
- (c) um íntron;
- (d) um elemento de expressão gênica;
- (e) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se
- 20 ligar a um ligante;
- (f) DNA que transcreve um aptâmero de RNA capaz de se ligar a um ligante e DNA que transcreve um RNA regulatório capaz de regular a expressão de uma seqüência alvo, caracterizado pelo fato de que a dita regulação é dependente da conformação do dito RNA regulatório, e a dita
- 25 conformação do dito RNA regulatório é afetada alostericamente pelo estado de ligação do dito aptâmero de RNA; e
- (g) pelo menos uma borda de T-DNA.

25. Constructo de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a dita proteína que confere tolerância é pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em uma 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, a 5-enolpiruvilchiquimato-

- 3-fosfato sintase da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, glifosato oxidoreductase, glifosato acetiltransferase, glifosato descarboxilase, *pat*, *bar*, dicamba monooxygenase, ácido 2,2-dicloropropiônico desalogenase, acetohidroxiácido sintase, acetolactato sintase, haloarilnitrilase, acetil-coenzima A
- 5 carboxilase modificada, diidropteroato sintase, polipeptídeo de fotossistema II de 32 kDa, antranilato sintase, ácido dihidrodipicolínico sintase, fitoeno desaturase, hidroxifenil piruvato dioxigenase, oxidase de protoporfirinogênio I modificada, e ariloxialcanoato dioxigenase.



A



B

Fig.1

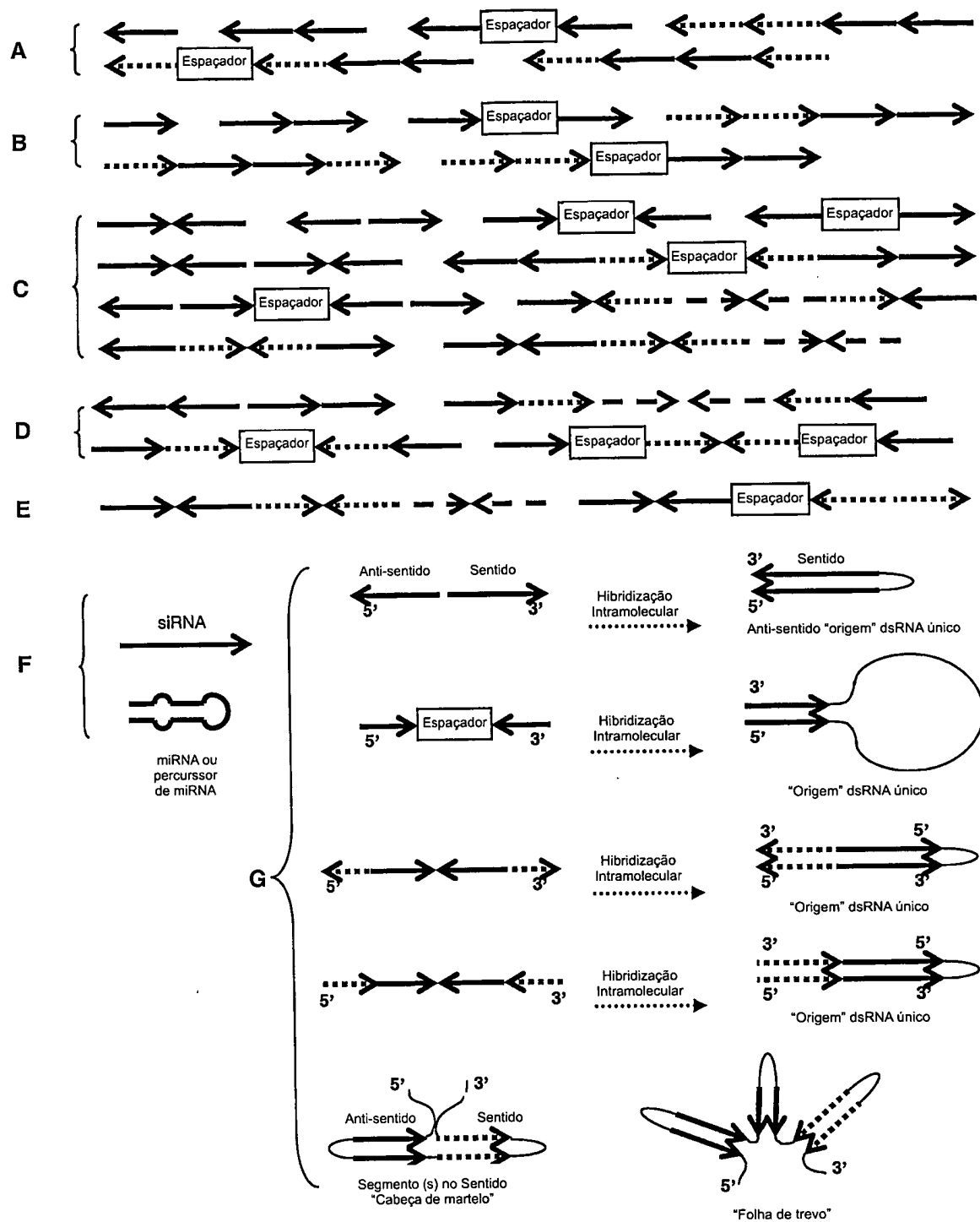


Fig.2

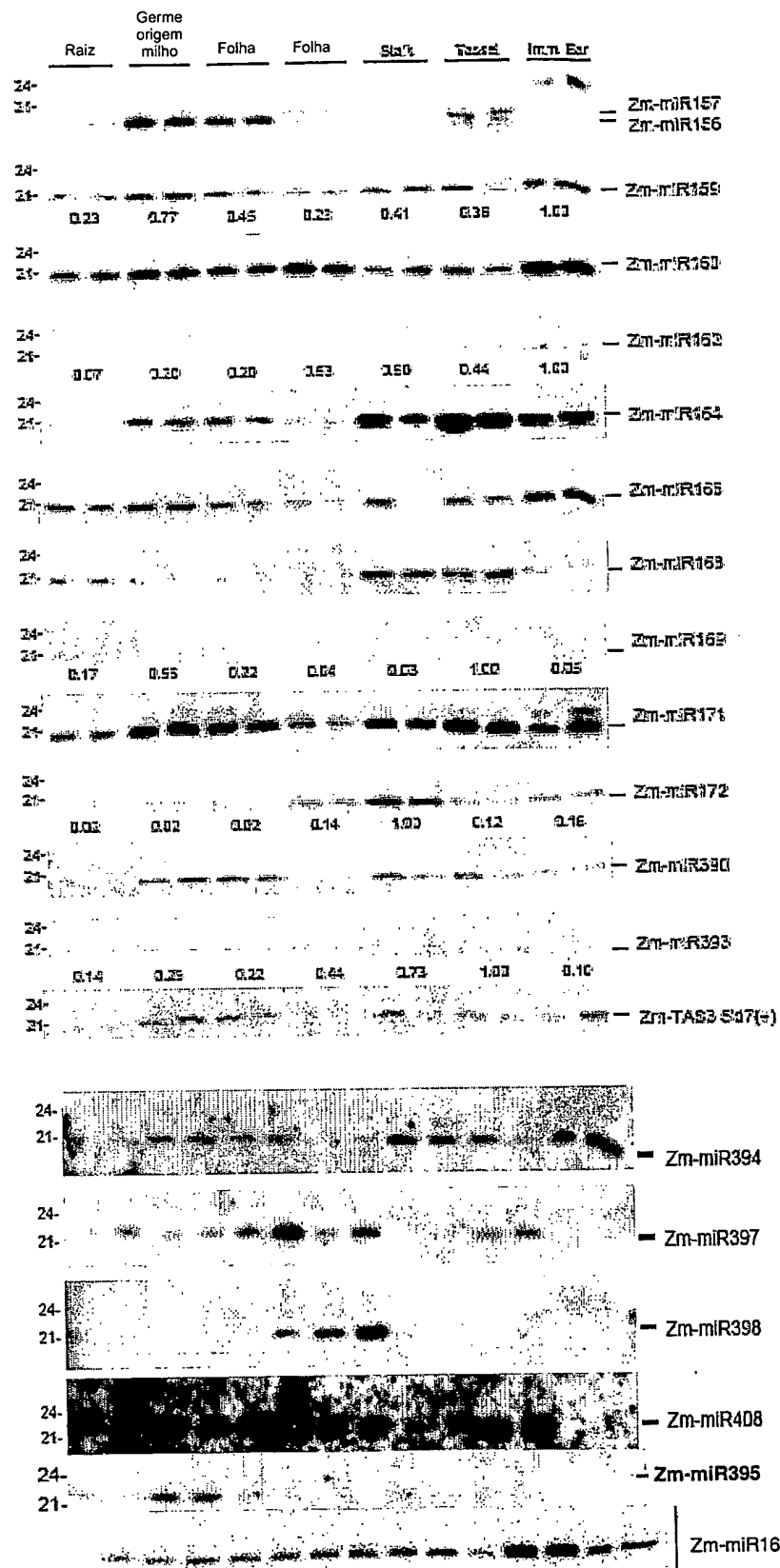


Fig.3


```

-----|-----|-----|-----|-----|
1  acacgctgaaaccatcttccacacactcaagccacactattggagaacac 50
51  acagggacaacacaccataaaccgccgcccgcggtagaagATGGCGCCAC 100
    M A P T 5
101 CGTGATGATGGCCTCGTCGGCCACCGCCGTCGCTCCGTTCCaGGGGCTCA 150
    6 V M M A S S A T A V A P F Q G L K 22
151 AGTCCACCGCCAGCCTCCCGTCGCCCGCCGCTCCTCCAGAAGCCTCGGC 200
    23 S T A S L P V A R R S S R S L G 38
201 AACGTCAGCAACGGCGGAAGGATCCGGTGCATGCAGGTGTGGCCggcCTA 250
    39 N V S N G G R I R C M Q V W P A Y 55
251 CGGCAACAAGAAGTTCGAGACGCTGTGCTACCTGCCGCCGCTGTGCAccG 300
    56 G N K K F E T L S Y L P P L S T G 72
301 GCGGgcgcatccgctgcatgcaggcCATGgccTTCTTCAAcCGGGTgATc 350
    73 G R I R C M Q A M A F F N R V I 88
351 ACCCTcACgGTgCCgTCgTCAGACGTGGTCAACTACTCgGAgATcTAcCA 400
    89 T L T V P S S D V V N Y S E I Y Q 105
401 GGTgGCTCCTCAGTATGTcAACCAgGCCCTGACccTGGCCcAAGTAcTTcC 450
    106 V A P Q Y V N Q A L T L A K Y F Q 122
451 AgGGCGCcATcGACGGcAGCACCCtGAGGTTCGAcTTCGAgAAgGCGTTA 500
    123 G A I D G S T L R F D F E K A L 138
501 CAgATcGCCAACGACATcCCGCAGGCCGcGTgGTcAACACCCtGAAcCA 550
    139 Q I A N D I P Q A A V V N T L N Q 155
551 GACCGTCCAGCAGGGGACCGTCCAGGTcCAGCGTcATGATCGAcAAGATcG 600
    156 T V Q Q G T V Q V S V M I D K I V 172
601 TGGACATCATGAaAATGTCTGTCCATCGTGATAGAcAACAAGAAGTTT 650
    173 D I M K N V L S I V I D N K K F 188
651 TGGGATCAGGTcACGGCTGCCATcACcAAcACCTTACGAAcCTGAACag 700
    189 W D Q V T A A I T N T F T N L N S 205
701 cCAgGAgTCgGAGgccTGGATCTTCTATTAcAAgGAGGACGCCcACAAGA 750
    206 Q E S E A W I F Y Y K E D A H K T 222
751 CGTCcTAcTATtAcAACATCCTCTTCGCCcATCCAGGACGAAGAGACGGGt 800
    223 S Y Y Y N I L F A I Q D E E T G 238
801 GGcGTGATGGCcACgcTGCCCATCGCCTTCGACATCAGTGTgGACATCGA 850
    239 G V M A T L P I A F D I S V D I E 255
851 GAAGgAGAAgGTCCTGTTCGTgACcATcAAGGAcACTGAGAATTACGCCG 900
    256 K E K V L F V T I K D T E N Y A V 272
901 TCACCGTCAAGGCGATCAACGTGGTcCAGGCACTccAgTCTAGCAGGGAT 950
    273 T V K A I N V V Q A L Q S S R D 288
951 TCTAAGGTGGTTGATGCGTTCAAATCGCCaCGGCACTTACCCCGGAAGAG 1000
    289 S K V V D A F K S P R H L P R K R 305
1001 GCATAAGATTGCTCTAACTCGtgatgActgcTGGATGCAGAGGTATTAT 1050
    306 H K I C S N S * * miRNA162 Sitio
1051 CGatgcgttttgacgtatgctcattcaggttggagccaatttggttgatg 1100
1101 tgtgtgcgagttcttgcgagtcctgatgagacatctctgtattgtgtttct 1150
1151 ttccccagtgttttctgtacttgtgtaatcggtaatcgccaacagattc 1200
1201 ggcgatgaataaatgagaaataaattgttctgattttgagtg 1242
-----|-----|-----|-----|-----|

```

SEO ID NO. 176

Fig.4

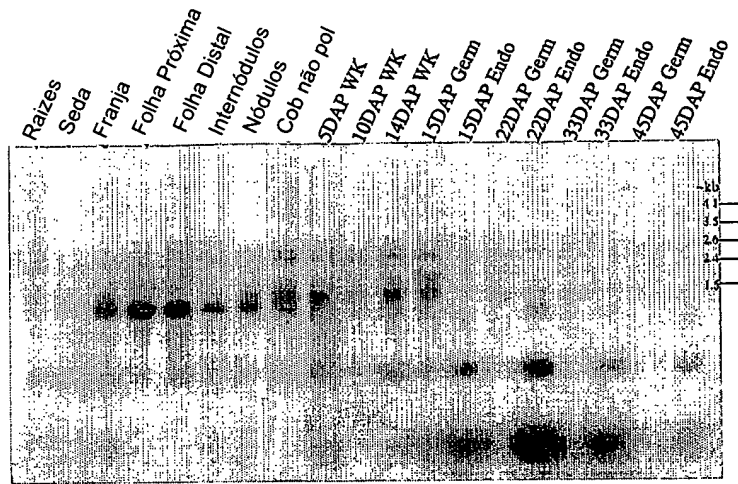
```

-----|-----|-----|-----|-----|
1 ACACGCTGACAagctGACTCTAGcagatCctctagaacctcttccacac 50
51 actcaagccacactattggagaacacacagggacaacacaccataaGATC 100
101 CAAGGGAGGCCCTCCGCCGCCCGGTAGAAAGTGATCAACcATGgccTTCT 150
      M A F F 6
151 TCAACCGGGTgATcACCCCTcACgGTgCCgTCgTCAGACGTGGTCAACTAC 200
      7 N R V I T L T V P S S D V V N Y 22
201 TCgGAgATcTAcCAGGTgGCTCCTCAGTATGTcAACCAgGCCCTGACccT 250
      23 S E I Y Q V A P Q Y V N Q A L T L 39
251 GGCCaAGTAcTTcCAGGGCCcATcGACGGcAGCACCCCTgAGGTTCGAcT 300
      40 A K Y F Q G A I D G S T L R F D F 56
301 TCGAgAAGCGGTtACAgATcGCCAACGACATcCCGCAgGCCcGCgGTgGTc 350
      57 E K A L Q I A N D I P Q A A V V 72
351 AACACCCTgAAcCAGACCGTCCAGCAGGGGACCGTCCAGGTCAGCGTcAT 400
      73 N T L N Q T V Q Q G T V Q V S V M 89
401 GATCGAcAAGATcGTGGACATCATGAAGAAATGTCCTGTCCATCGTGATAG 450
      90 I D K I V D I M K N V L S I V I D 106
451 AcAAcAAGAAGTTTtGGGATCAGGTcACGGCTGCcATcACcAAcACCTTC 500
      107 N K K F W D Q V T A A I T N T F 122
501 ACGAAcCTGAACAgcCAGGAgTCgGAGgccTGGATCTTCTATtAcAAgGA 550
      123 T N L N S Q E S E A W I F Y Y K E 139
551 gGACGCCCCACAAGACGTcTAcTAtTAcAACATCCTCTTCGCCcATCCAGG 600
      140 D A H K T S Y Y Y N I L F A I Q D 156
601 ACGAAGAGACGGGtGGcGTGATGGCCACgcTGCCCATCGCCTTCGACATC 650
      157 E E T G G V M A T L P I A F D I 172
651 AGTGTgGACATCGAGAAGGAgAAGGTCTGTTCGTgACcATcAAGGAcAC 700
      173 S V D I E K E K V L F V T I K D T 189
701 TGAGAAATTACCCGTCACCGTCAAGGCGATCAACGTGGTcCAGGCACTcc 750
      190 E N Y A V T V K A I N V V Q A L Q 206
751 AgTCTAGCAGGGATtCTAAGGTGGTTGATGCGTTCAAATCGCCaCGGCAC 800
      207 S S R D S K V V D A F K S P R H 222
801 TTACCCCGGAAGAGGCATAAGATtTGCTCTAACTCGtgatgAAAgTACGT 850
      223 L P R K R H K I C S N S * * mirNA164
851 GCCCTGCTTCTCCATCTGCATGCGTTTGGACGTATGCTCATTcAGGTTGG 900
901 AGCCAAATTGGTTGATGTGTGTGCGAGTTCTTGCGAGTCTGATGAGACAT 950
951 CTCTGT 956
-----|-----|-----|-----|-----|

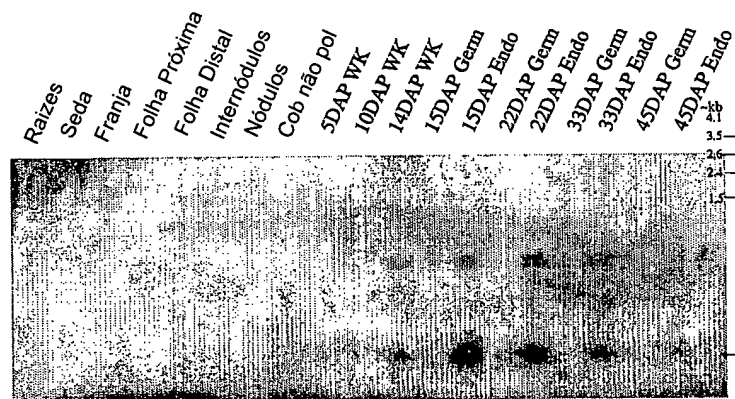
```

SEQ ID NO. 177

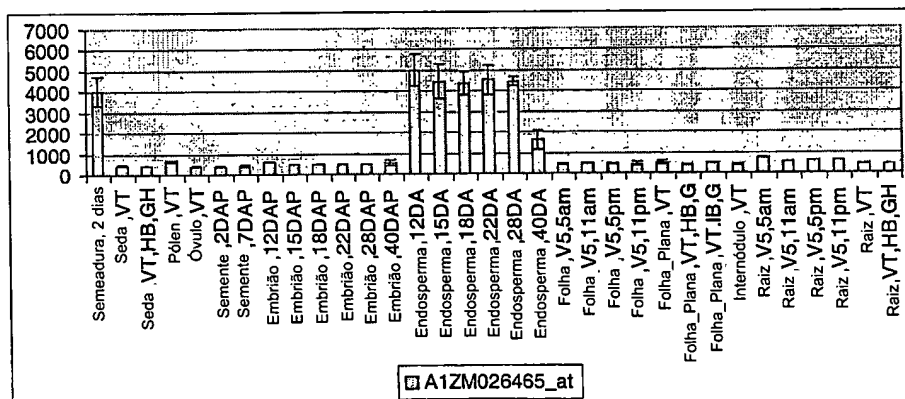
Fig.5



A



B



C

Fig.6

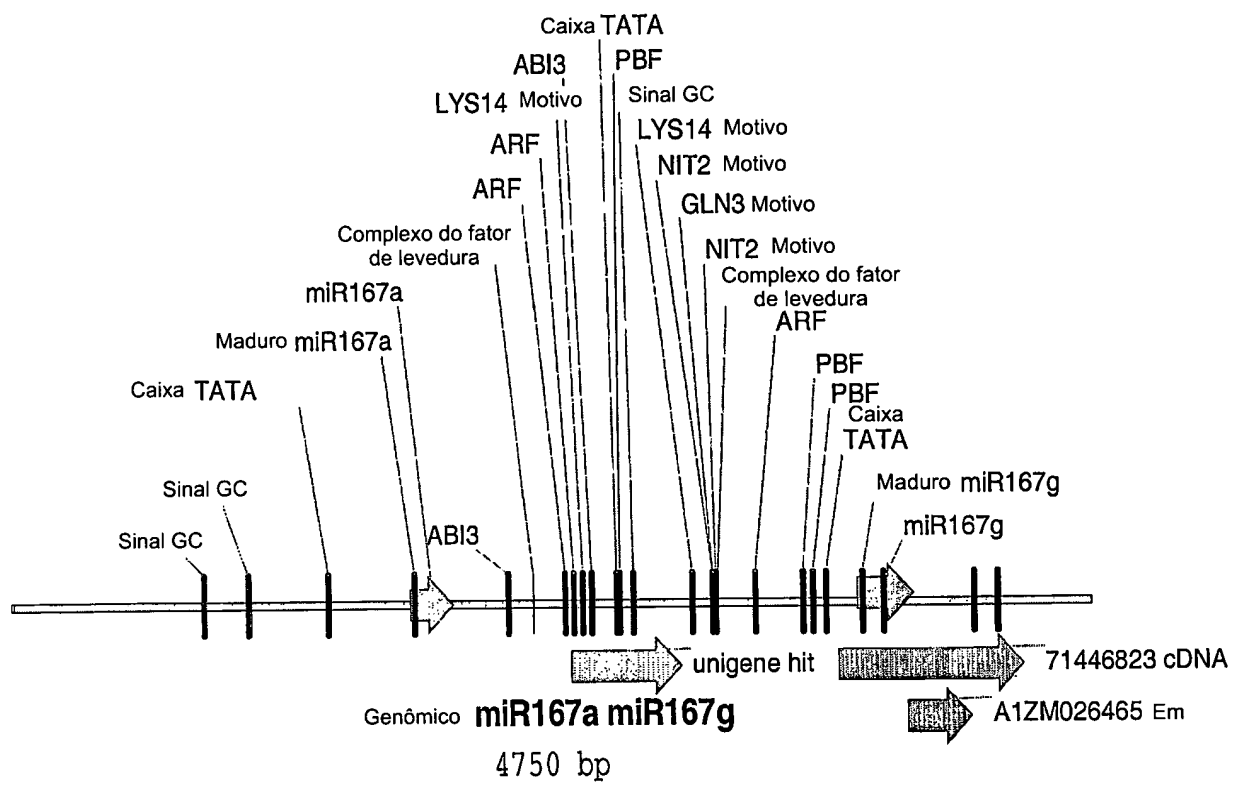


Fig.7

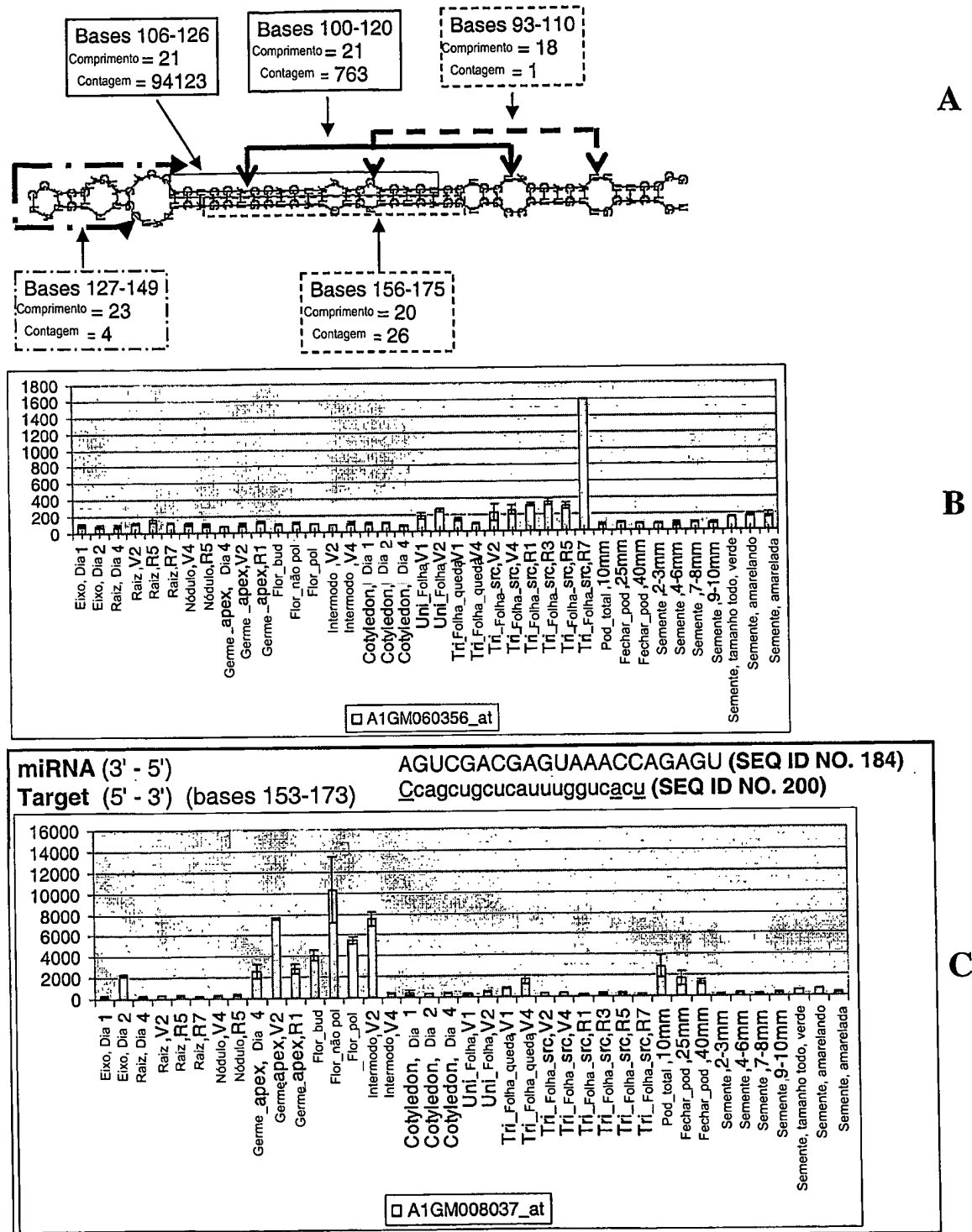
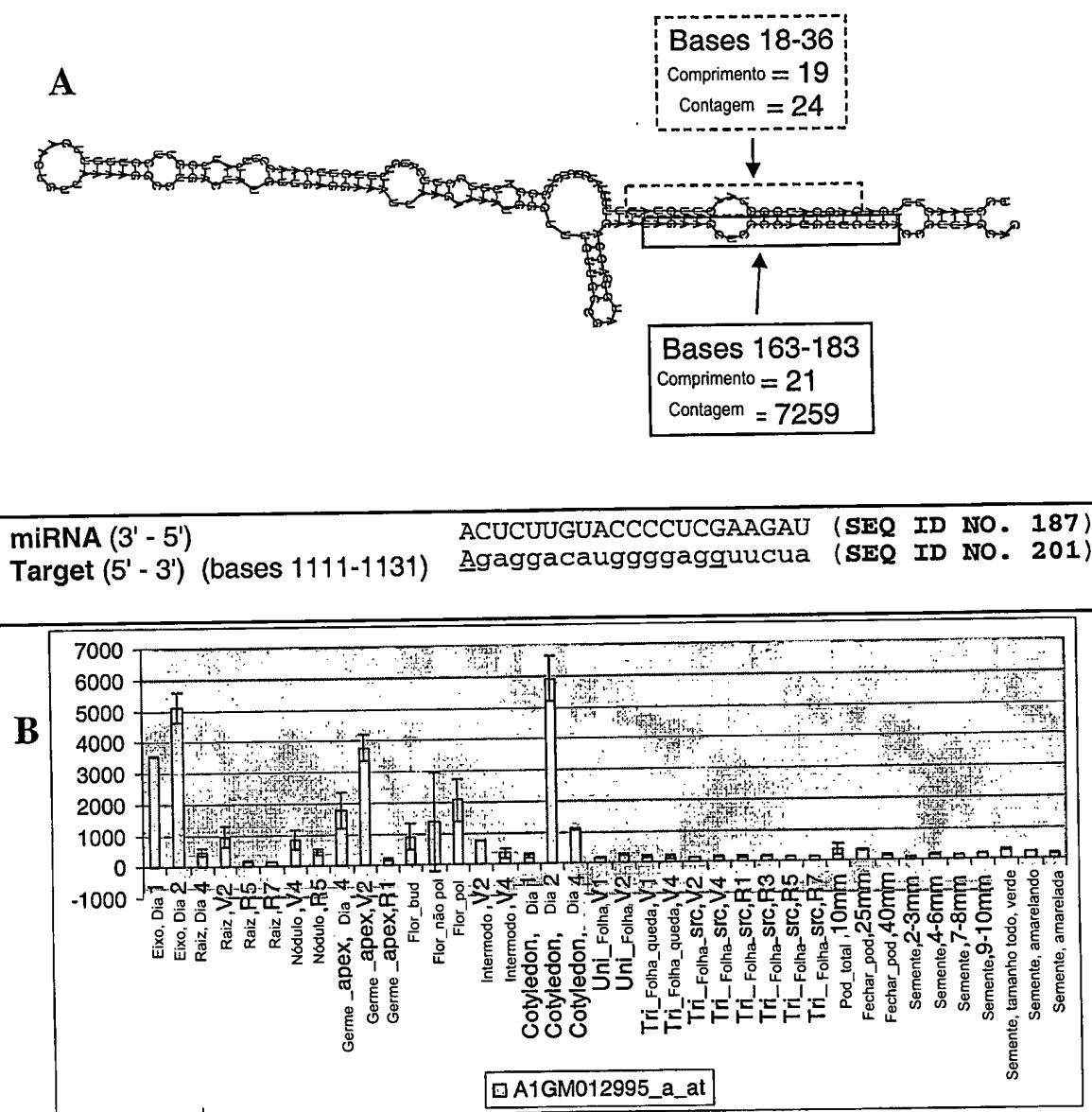


Fig.8



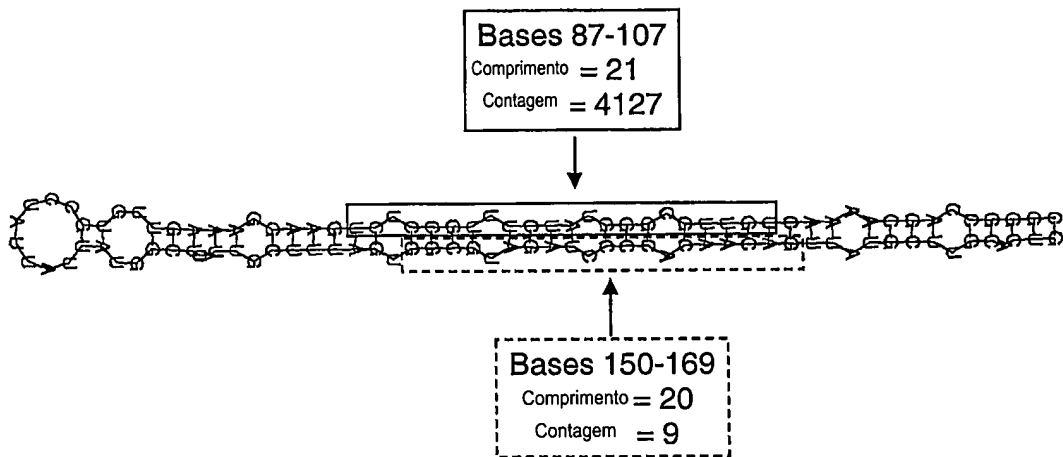


Fig.10

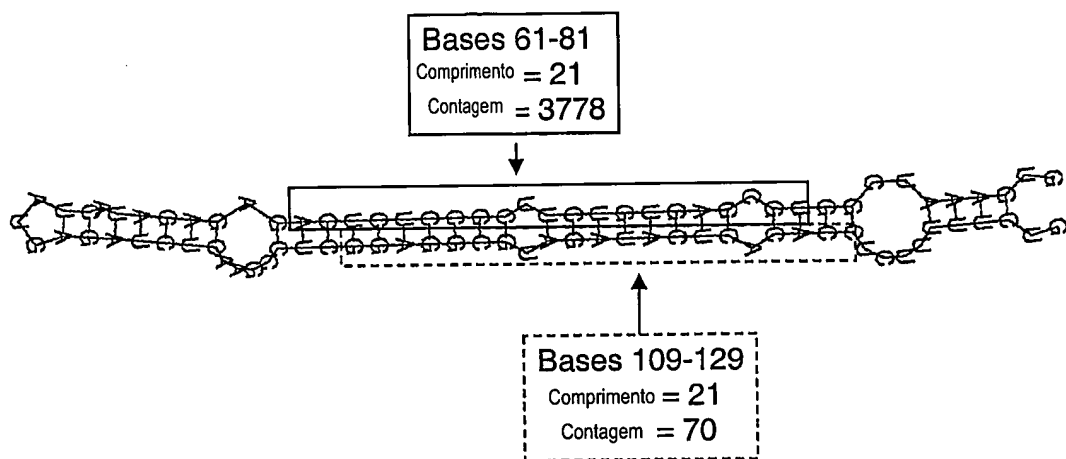
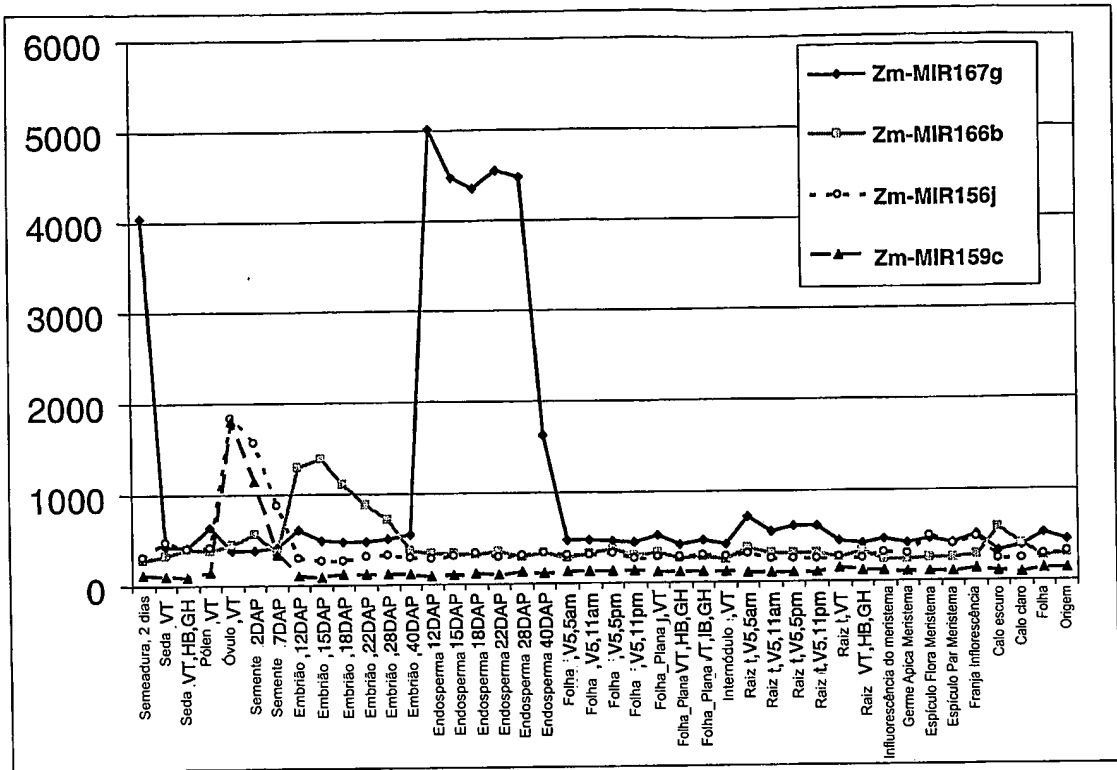


Fig.11



Fig.12

A



B

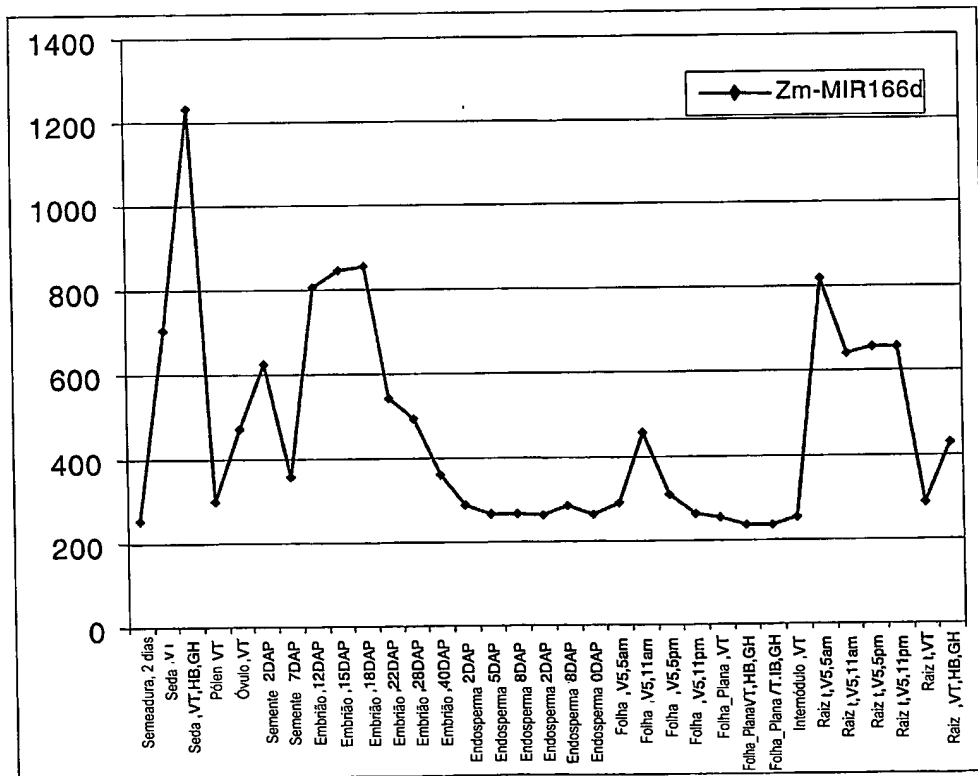


Fig.13

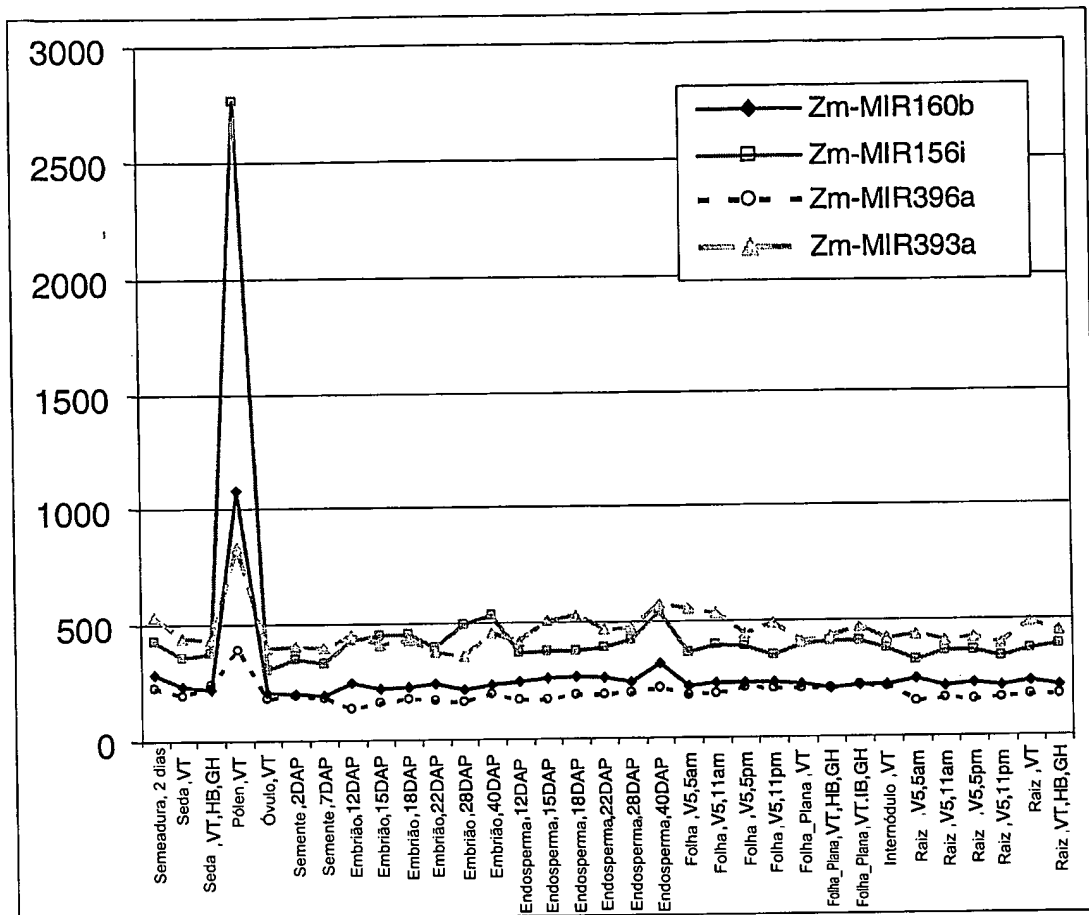


Fig.14

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS PARA PRODUZIR SEMENTE HÍBRIDA".

A presente invenção refere-se a métodos para a produção de uma semente híbrida não natural. São também descritos miRNAs específicos e sítios de reconhecimento de miRNA úteis para conferir esterilidade induzida em uma plantação, e construto de DNA recombinante incluindo tais sítios de reconhecimento de miRNA exógeno.