



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

(11) BR 112015021857-1 B1



(22) Data do Depósito: 07/03/2014

(45) Data de Concessão: 10/05/2022

(54) Título: MÉTODO PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA SOJA EM UMA PLANTA DE SOJA QUE EXPRESSA PROTEÍNA MYBTF E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE SOJA TRANSGÊNICA QUE EXPRESSA PROTEÍNA MYBTF

(51) Int.Cl.: C12N 15/82.

(52) CPC: C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 08/03/2013 EP 13158321.3.

(73) Titular(es): BASF PLANT SCIENCE COMPANY GMBH.

(72) Inventor(es): HOLGER SCHULTHEISS; RALF FLACHMANN; TOBIAS MENTZEL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2014054461 de 07/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/135682 de 12/09/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/09/2015

(57) Resumo: RESUMO ?MÉTODO PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA FÚNGICA EM UMA PLANTA, CONSTRUCTO DE VETOR RECOMBINANTE, PLANTA TRANSGÊNICA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA, USO DE QUALQUER UM DOS ÁCIDOS NUCLEICOS EXÓGENOS, PARTE COLETÁVEL DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA, PRODUTO DERIVADO DE UMA PLANTA E MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO E PARA CRIAR UMA PLANTA RESISTENTE A FUNGOS. A presente invenção refere-se a um método para aumentar a resistência contra patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales, em plantas e/ou células vegetais. Isto é alcançado por aumento da expressão de uma proteína MybTF ou fragmento da mesma em uma planta, parte da planta e/ou célula vegetal, em comparação a plantas tipo selvagem, partes da planta tipo selvagem e/ou células vegetais tipo selvagem. Além disso, a invenção refere-se a plantas transgênicas, partes da planta e/ou células vegetais que têm uma resistência aumentada contra patógenos fúngicos, em particular, patógenos da Ordem Pucciniales, e a vetores de expressão recombinantes que compreendem uma sequência que é idêntica ou homóloga a uma sequência que codifica uma proteína MybTF.

**“MÉTODO PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA SOJA EM
UMA PLANTA DE SOJA QUE EXPRESSA PROTEÍNA MybTF E MÉTODO
PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE SOJA TRANSGÊNICA QUE
EXPRESSA PROTEÍNA MybTF”**

[001] Este pedido reivindica prioridade ao número de pedido de patente EP 13158321.3, depositado em 8 de março de 2013, que é incorporado ao presente pedido como referência em sua totalidade.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a um método para aumentar a resistência contra patógenos fúngicos, em particular, patógenos da Ordem Pucciniales, por exemplo, ferrugem da soja, em plantas, partes da planta e/ou células vegetais. Isto é alcançado por aumento da expressão e/ou atividade de uma proteína de fator de transcrição tipo Myb (MybTF) em uma planta, parte da planta e/ou célula vegetal em comparação a plantas tipo selvagem, partes da planta tipo selvagem e/ou células vegetais tipo selvagem.

[003] Além disso, a invenção refere-se a plantas transgênicas, partes da planta e/ou células vegetais que têm uma resistência aumentada contra patógenos fúngicos, em particular, patógenos da Ordem Pucciniales, por exemplo, ferrugem da soja, e a vetores de expressão recombinantes que compreendem uma sequência que é idêntica ou homóloga a uma sequência que codifica uma proteína MybTF.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] O cultivo de plantas de cultura agrícolas serve principalmente para a produção de gêneros alimentícios para humanos e animais. Monoculturas em particular, que são a regra hoje em dia, são altamente suscetíveis a uma dispersão de doenças similar à epidemia. O resultado é produção acentuadamente reduzida. Até hoje, os organismos patogênicos foram controlados principalmente com o uso de pesticidas. Hoje

em dia, a possibilidade de modificar diretamente a disposição genética de uma planta ou patógeno também está aberta ao homem.

[005] A resistência geralmente descreve a capacidade de uma planta prevenir, ou pelo menos abreviar a infestação e colonização por um patógeno nocivo. Mecanismos diferentes podem ser diferenciados na resistência que ocorre naturalmente, com os quais as plantas se defendem da colonização por organismos fitopatogênicos. Essas interações específicas entre o patógeno e o hospedeiro determinam o curso da infecção (Schopfer e Brennicke (1999) *Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, Alemanha).

[006] Com referência à resistência específica de raça, também chamada resistência do hospedeiro, uma diferenciação é feita entre interações compatíveis e incompatíveis. Na interação compatível, uma interação ocorre entre um patógeno virulento e uma planta suscetível. O patógeno sobrevive, e pode acumular estruturas de reprodução, enquanto o hospedeiro na maioria das vezes morre. Por outro lado, ocorre uma interação incompatível quando o patógeno infecta a planta, mas é inibido em seu crescimento antes ou depois de um desenvolvimento fraco de sintomas (principalmente pela presença de genes R da família NBS-LRR, consulte abaixo). No último caso, a planta é resistente ao respectivo patógeno (Schopfer e Brennicke, consulte acima). No entanto, este tipo de resistência é específico para uma certa linhagem ou patógeno.

[007] Em ambas as interações, compatíveis e incompatíveis, ocorre uma reação defensiva e específica do hospedeiro ao patógeno. Na natureza, no entanto, essa resistência é com frequência superada devido ao rápido desenvolvimento evolutivo de novas raças virulentas dos patógenos (Neu *et al.* (2003) *American Cytopathol. Society, MPMI* 16 nº 7: 626-633).

[008] A maioria dos patógenos é específico para espécies de

plantas. Isso significa que um patógeno pode induzir uma doença em uma determinada espécie de planta, mas não em outra espécie de planta (Heath (2002) *Can. J. Plant Pathol.* 24: 259-264). A resistência contra um patógeno em certas espécies de planta é chamada de resistência de não hospedeiro. A resistência de não hospedeiro oferece proteção forte, ampla e permanente de fitopatógenos. Os genes que fornecem resistência de não hospedeiro fornecem a oportunidade de uma proteção forte, ampla e permanente contra certas doenças em plantas não hospedeiras. Em particular, essa resistência trabalha para diferentes linhagens do patógeno.

[009] Os fungos são distribuídos mundialmente. Aproximadamente 100.000 espécies diferentes de fungos são conhecidas até a presente data. Destas, as ferrugens são de grande importância. Elas podem ter um ciclo complicado de desenvolvimento com até cinco etapas diferentes de esporo (espermatium, aecidiospore, uredósporo, teleutósporo e basidiósporo).

[0010] Durante a infecção de plantas por fungos patogênicos, diferentes fases são geralmente observadas. As primeiras fases da interação entre fungos fitopatogênicos e suas plantas hospedeiras potenciais são decisivas para a colonização da planta pelo fungo. Durante o primeiro estágio da infecção, os esporos tornam-se fixados à superfície das plantas, germinam e o fungo penetra na planta. Os fungos podem penetrar na planta através de portas existentes como estômatos, lenticelas, hidátodos ou ferimentos, ou então eles penetram na epiderme da planta diretamente como o resultado da força mecânica e com a ajuda de enzimas que digerem a parede celular. Estruturas específicas de infecção são desenvolvidas para penetração da planta.

[0011] Imediatamente após o reconhecimento de um patógeno potencial, a planta começa a induzir reações de defesa. Na maioria das vezes a presença do patógeno é percebida através de receptores conhecidos PAMP,

uma classe de receptor transmembrana similar a quinases que reconhecem moléculas conservadas associadas a patógeno (por exemplo, flagelina ou quitina). A jusante dos receptores PAMP, os fitormônios ácido salicílico (SA), jasmonato (JA) e etileno (ET) desempenham um papel importante na regulação das diferentes reações de defesa. Dependendo da relação entre os diferentes fitormônios, diferentes reações de defesa são induzidas pela célula hospedeira. Em geral, a defesa dependente de SA está ligada à resistência contra patógenos biotróficos, enquanto que as reações de defesa dependentes de JA/ET são, na maioria dos casos, contra patógenos necrotróficos (e insetos).

[0012] Outro mecanismo de resistência mais específico está baseado na presença dos chamados genes de resistência (genes R). A maioria dos genes R pertencem à família do gene com sítio de ligação de nucleotídeo e repetição rica em leucina (NBS-LRR) e funcionam no monitoramento na presença de proteínas efetoras de patógenos (fatores virulentos, fatores não virulentos). Após reconhecer as proteínas derivadas de patógeno, uma forte reação de defesa (em sua maioria acompanhada por uma morte celular programada) é produzida.

[0013] A ferrugem da soja *Phakopsora pachyrhizi* penetra diretamente na epiderme da planta. Depois de atravessar a célula da epiderme, os fungos alcançam o espaço intercelular do mesófilo, onde o fungo começa a se espalhar através das folhas. Para adquirir nutrientes, o fungo penetra nas células do mesófilo e desenvolve haustório dentro da célula do mesófilo. Durante o processo de penetração, a membrana plasmática da célula do mesófilo penetrada permanece intacta. Portanto, o fungo da ferrugem da soja estabelece uma interação biotrófica com a soja.

[0014] Os fungos fitopatogênicos biotróficos, como a ferrugem da soja e todos os outros fungos da ferrugem, dependem no metabolismo de células vivas das plantas para sua nutrição. Esse tipo de fungo pertence ao

grupo de fungos biotróficos, como outros fungos da ferrugem, fungos de míldio (*downy mildew*) ou oomicetos patógenos como o gênero *Phytophthora* ou *Peronospora*. Os fungos fitopatogênicos necrotróficos dependem de células mortas das plantas para sua nutrição, por exemplo, espécie do gênero *Fusarium*, *Rhizoctonia* ou *Mycosphaerella*. A ferrugem da soja ocupou uma posição intermediária, visto que penetra na epiderme diretamente, como consequência a célula penetrada torna-se necrótica. Após a penetração, o fungo muda para um estilo de vida biotrófico obrigatório. O subgrupo dos patógenos fúngicos biotróficos que segue essencialmente como uma estratégia de infecção é heminecrotrófico. Ao contrário de um patógeno heminecrotrófico, um patógeno hemibiotrófico vive por um período curto de tempo de uma maneira biotrófica e subsequentemente inicia a morte da célula hospedeira e/ou do organismo hospedeiro, isto é, muda o resto de seu ciclo vital para um estilo de vida necrotrófico.

[0015] A ferrugem da soja tornou-se cada vez mais importante nos últimos tempos. A doença pode ser causada pela ferrugem biotrófica *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*. Eles pertencem à Classe Basidiomycota, Ordem Uredinales, Família Phakopsoraceae. Ambas as ferrugens infectam um amplo espectro de plantas hospedeiras leguminosas. *P. pachyrhizi*, também conhecida como ferrugem asiática, é o patógeno mais agressivo na soja (*Glycine max*) e é, portanto, pelo menos no momento, de grande importância para a agricultura. *P. pachyrhizi* pode ser encontrado em quase todas as sojas de regiões tropicais e subtropicais do mundo. *P. pachyrhizi* é capaz de infectar 31 espécies de 17 famílias de Leguminosas, sob condições naturais, e é capaz de crescer em mais de 60 espécies sob condições controladas (Sinclair *et al.* (eds.), *Proceedings of the rust workshop* (1995), National SoyaResearch Laboratory, Publicação nº 1 (1996); Rytter J.L. *et al.*, *Plant Dis.* 87, 818 (1984)). Descobriu-se *P. meibomiae* na Bacia do

Caribe e em Porto Rico, e não causou dano substancial até agora.

[0016] *P. pachyrhizi* atualmente pode ser controlado no campo só por meio de fungicidas. Plantas de soja com resistência ao espectro inteiro dos isolados não está disponível. Buscando-se acessos de soja resistentes, seis genes R dominantes da família NBS-LRR, denominados Rpp1-5 e Rpp? (Hyuuga), os quais medeiam resistência da soja a *P. pachyrhizi*, foram descobertos por triagem de milhares de variedades de soja. Como os genes R são derivadas de um hospedeiro (soja), a resistência foi rapidamente perdida, conforme *P. pachyrhizi* desenvolve novas raças virulentas. Portanto, existe uma grande necessidade de descobrir genes R que são derivados de plantas não hospedeiras (por exemplo, *Arabidopsis*), visto que eles são conhecidos por serem mais duráveis.

[0017] Nos anos recentes, doenças fúngicas, por exemplo, ferrugem da soja, ganharam importância como peste na produção agrícola. Havia, portanto, uma demanda na técnica anterior para desenvolver métodos para controlar fungos e fornecer plantas resistentes a fungos.

[0018] Muita pesquisa foi realizada no campo de oídio (*powdery mildew*) e míldio que infectam a camada epidérmica das plantas. No entanto, o problema para lidar com a ferrugem da soja que infeta o mesófilo permanece não solucionado.

[0019] O objetivo da presente invenção é, entre outros, fornecer um método de resistência crescente contra patógenos fúngicos, preferencialmente patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales), preferencialmente contra patógenos fúngicos da Família Phacopsoraceae, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phakopsora*, mais preferencialmente contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja.

[0020] Surpreendentemente, verificou-se que patógenos fúngicos,

em particular, da ordem *Pucciniales*, por exemplo, ferrugem da soja, podem ser controlados por aumento da expressão de uma proteína MybTF. O MybTF descrito nesta invenção pertence à Família R2R3-MYB.

[0021] A presente invenção, portanto, fornece um método para aumentar a resistência contra patógenos fúngicos, preferencialmente contra patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem *Pucciniales*), preferencialmente contra patógenos fúngicos da Família *Phacopsoraceae*, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phakopsora*, com a máxima preferência contra patógenos fúngicos de *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja, em plantas transgênicas, partes de plantas transgênicas ou células vegetais transgênicas por superexpressão de um ou mais ácidos nucleicos de MybTF.

[0022] Um objetivo adicional é fornecer plantas transgênicas resistentes a patógenos fúngicos, preferencialmente patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem *Pucciniales*), preferencialmente da Família *Phacopsoraceae*, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phakopsora*, com a máxima preferência contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja, um método para produzir essas plantas, bem como uma construção de vetor útil para os métodos acima.

[0023] Portanto, a presente invenção também se refere a uma construção de vetor recombinante e uma planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica que compreende um ácido nucleico de MybTF. Além disso, é reivindicado um método para a produção de uma planta transgênica, parte de planta transgênica ou célula vegetal transgênica com o uso do ácido nucleico da presente invenção. Além disso, é reivindicado no presente pedido o uso de um ácido nucleico ou do vetor recombinante da presente invenção para a transformação de uma planta, parte da planta ou

célula vegetal.

[0024] Os objetivos da presente invenção, como descritos acima, são alcançados pelo assunto das principais reivindicações. Realizações preferenciais da invenção são definidas pelo assunto das reivindicações dependentes.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[0025] O objetivo da presente invenção é, entre outros, fornecer um método de resistência crescente contra patógenos fúngicos, preferencialmente patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales), preferencialmente contra patógenos fúngicos da Família Phacopsoraceae, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phacopsora*, mais preferencialmente contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja.

[0026] Surpreendentemente, verificou-se que a resistência a patógenos fúngicos, em particular, da ordem *Pucciniales*, por exemplo, ferrugem da soja, pode ser controlada por aumento da expressão de uma proteína MybTF.

[0027] A presente invenção, portanto, fornece um método para aumentar a resistência contra patógenos fúngicos, preferencialmente patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales), preferencialmente contra patógenos fúngicos da Família Phacopsoraceae, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phacopsora*, com a máxima preferência contra patógenos fúngicos de *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja, em plantas transgênicas, partes de plantas transgênicas ou células vegetais transgênicas por superexpressão de um ou mais ácidos nucleicos de MybTF.

[0028] Um objetivo adicional é fornecer plantas transgênicas resistentes a patógenos fúngicos, preferencialmente patógenos da

ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales), preferencialmente da Família Phacopsoraceae, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phacopsora*, com a máxima preferência contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja, um método para produzir essas plantas, bem como uma construção de vetor útil para os métodos acima.

[0029] Portanto, a presente invenção também se refere a uma construção de vetor recombinante e uma planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica que compreende um ácido nucleico de MybTF. Além disso, é reivindicado um método para a produção de uma planta transgênica, parte de planta transgênica ou célula vegetal transgênica com o uso do ácido nucleico da presente invenção. Além disso, é reivindicado no presente pedido o uso de um ácido nucleico ou do vetor recombinante da presente invenção para a transformação de uma planta, parte da planta ou célula vegetal.

[0030] Os objetivos da presente invenção, como descritos acima, são alcançados pelo assunto das principais reivindicações. Realizações preferenciais da invenção são definidas pelo assunto das reivindicações dependentes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS VÁRIAS VISTAS DOS DESENHOS

[0031] A Figura 1 mostra o sistema de escore que é usado para determinar o nível de área de folha doente de plantas de soja tipo selvagem e transgênica contra o fungo da ferrugem *P. pachyrhizi* (conforme descrito em GODOY, C.V., KOGA, L.J. e CANTERI, M.G. Escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem da soja. *Fitopatologia Brasileira* 31:063-068. 2006).

[0032] A Figura 2 mostra a ilustração esquemática do vetor de

transformação de planta que abriga o fragmento de DNA de MybTF mediante controle do promotor de ubiquitina de salsa.

[0033] A Figura 3 mostra o alinhamento da sequência genômica de MybTF de *Arabidopsis* (AT3G29020-genômica, número de acesso 4010724011, SEQ ID NO: 8), as duas sequências codificadoras putativas de MybTF, que são derivadas da sequência genômica, CDS1 MybTF (At3G29020.1-CDS, nº de acesso NM_113823, SEQ ID NO: 6) e CDS2 MybTF (At3G29020.2-CDS, número de acesso TAIR 4010715313, SEQ ID NO: 4) e a sequência da sequência de MybTF conforme usada nos exemplos (MybTF-DNA, SEQ ID NO: 1).

[0034] A Figura 4 mostra o resultado dos escores de 15 plantas de soja transgênica (geração T₀) que expressam a construção do vetor de superexpressão de MybTF. Plantas de soja T₀ que abrigam o cassete de expressão de MybTF foram inoculadas com esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. A expressão do MybTF foi verificada por RT-PCR. A avaliação da área de folha doente em todas as folhas foi realizada 14 dias após inoculação. A média da porcentagem da área de folha mostrando colônias fúngicas ou amarelamento/acastanhado forte em todas as folhas foi considerada como área de folha doente. Todas as 15 plantas de soja T₀ que expressam o MybTF (expressão verificada por RT-PCR) foram avaliadas em paralelo com plantas de controle não transgênicas. A média da área de folha doente é mostrada na Figura 4. A superexpressão de MybTF reduz significativamente (***) : $p < 0,001$) a área de folha doente em comparação a plantas de controle não transgênicas, em 72,3%.

[0035] A Figura 5 contém uma breve descrição das sequências da lista de sequências.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0036] A presente invenção pode ser mais facilmente compreendida por referência à seguinte descrição detalhada das realizações

preferenciais da invenção e dos exemplos incluídos no presente pedido.

DEFINIÇÕES

[0037] Salvo indicação em contrário, os termos usados no presente pedido são para serem entendidos de acordo com uso convencional pelos técnicos no assunto. Em adição às definições de termos fornecidos no presente pedido, definições de termos comuns em biologia molecular também podem ser encontradas em Rieger *et al.*, 1991 *Glossary of genetics: classical and molecular*, 5ª Ed., Berlin: Springer-Verlag; and in *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols, uma *joint venture* entre Greene Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1998).

[0038] Entende-se que, como usado no relatório descritivo e nas reivindicações, “um” ou “uma” pode significar um ou mais, dependendo do contexto em que é usado. Dessa forma, por exemplo, referência a “uma célula” pode significar que pelo menos uma célula pode ser utilizada. Entende-se que a terminologia usada no presente pedido é para o propósito de descrever somente realizações específicas e não se destina a limitar.

[0039] Ao longo deste pedido, são referenciadas várias publicações. As divulgações de todas essas publicações e as referências citadas dentro dessas publicações são integralmente incorporadas ao presente pedido como referência neste pedido a fim de descrever mais completamente o estado da técnica ao qual esta invenção pertence. Técnicas padrão para clonagem, isolamento de DNA, amplificação e purificação, para reações enzimáticas envolvendo DNA ligase, DNA polimerase, endonucleases de restrição e similares, e várias técnicas de separação são as conhecidas na técnica e comumente empregadas pelos técnicos no assunto. Uma série de técnicas padrão são descritas em Sambrook *et al.*, 1989 *Molecular Cloning*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; Maniatis *et*

al., 1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; Wu (Ed.) 1993 *Meth. Enzymol.* 218, Parte I; Wu (Ed.) 1979 *Meth Enzymol.* 68; Wu *et al.*, (Eds.) 1983 *Meth. Enzymol.* 100 e 101; Grossman e Moldave (Eds.) 1980 *Meth. Enzymol.* 65; Miller (Ed.) 1972 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Old e Primrose, 1981 *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif e Wensink, 1982 *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (Ed.) 1985 *DNA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK; Hames e Higgins (Eds.) 1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; e Setlow e Hollaender 1979 *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, Nova York. As abreviações e nomenclatura, quando empregadas, são consideradas padrão na área e comumente usadas em revistas profissionais como as citadas no presente pedido.

[0040] “Homólogos” de uma proteína englobam peptídeos, oligopeptídeos, polipeptídeos, proteínas e/ou enzimas que têm substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos em relação à proteína não modificada em questão, e que têm atividade funcional similar à da proteína não modificada a partir da qual eles são derivados.

[0041] “Homólogos” de um ácido nucleico englobam nucleotídeos e/ou polinucleotídeos que têm substituições, deleções e/ou inserções de ácidos nucleicos em relação ao ácido nucleico não modificado em questão, em que a proteína codificada por esses ácidos nucleicos tem atividade funcional similar à proteína codificada não modificada pelo ácido nucleico não modificado a partir do qual eles são derivados. Em particular, homólogos de um ácido nucleico podem englobar substituições com base no código de aminoácidos degenerativos.

[0042] Os termos “identidade”, “homologia” e “similaridade” são usados no presente pedido de forma intercambiável. “Identidade” ou

“homologia” ou “similaridade” entre duas sequências de ácidos nucleicos ou sequências de aminoácidos refere-se em cada caso ao longo de todo o comprimento da respectiva sequência de ácidos nucleicos de MybTF ou sequência de aminoácidos de MybTF.

[0043] Preferencialmente, a “porcentagem de identidade de sequência” é calculada por comparação de duas sequências perfeitamente alinhadas ao longo de uma região específica, que determina o número de posições nas quais bases ou aminoácidos idênticos ocorrem em ambas as sequências para produzir o número de posições compatíveis, dividindo-se o número dessas posições pelo número total de posições em que na região sendo comparada e multiplicando-se o resultado por 100.

[0044] Métodos para o alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica, esses métodos incluem GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA e TFASTA. GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch ((1970) *J Mol Biol* 48: 443-453) para encontrar o alinhamento global (isto é, que abrange as sequências completas) de duas sequências, que maximiza o número de correspondências e minimiza o número de *gaps*. O algoritmo BLAST (Altschul *et al.* (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10) calcula o percentual de identidade, similaridade ou homologia de sequência e realiza uma análise estatística da identidade, similaridade ou homologia entre as duas sequências. O programa de computação para realização da análise BLAST está disponível publicamente junto ao National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Homólogos podem ser facilmente identificados com o uso, por exemplo, do algoritmo de alinhamento de múltiplas sequências ClustalW (versão 1.83), com os parâmetros padrão de alinhamento em pares, e um método de escore em porcentagem. As porcentagens globais de similaridade/homologia/identidade também podem ser determinadas com o uso de um dos métodos disponíveis no pacote do programa de computação

MatGAT (Campanella *et al.*, BMC Bioinformatics. 10 de julho de 2003; 4:29. *MatGAT: an application that generates similarity/homology/identity matrices using protein or DNA sequences.*). A edição manual secundária pode ser realizada para otimizar o alinhamento entre motivos conservados, como seria evidente para um técnico no assunto. Além disso, ao invés de usar sequências inteiras para a identificação de homólogos, domínios específicos podem também ser usados. Os valores de identidade de sequência podem ser determinados ao longo do ácido nucleico completo, da sequência de aminoácidos ou ao longo dos domínios selecionados ou motivo(s) conservado(s), com o uso dos programas acima mencionados acima com o uso dos parâmetros padrão. Para alinhamentos locais, o algoritmo de Smith-Waterman é particularmente útil (Smith TF, Waterman MS (1981) *J. Mol. Biol* 147(1);195-7).

[0045] A identidade de sequência também pode ser calculada por meio do programa Vector NTI Suite 7.1 da companhia Informax (EUA) que emprega o Método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl. Biosci.* 1989 Apr; 5(2):151-1) com as seguintes configurações:

[0046] Parâmetro de alinhamento múltiplo:

- | | |
|--|-----------|
| - Penalidade por abertura de gap | 10 |
| - Penalidade por extensão de gap | 10 |
| - Faixa de penalidade de separação de gap | 8 |
| - Penalidade por separação de gap | desligado |
| - % de identidade para atraso de alinhamento | 40 |
| - Gaps de resíduo específico | desligado |
| - Gap de resíduo hidrofílico | desligado |
| - Pesagem de transição | 0 |

[0047] Parâmetro de alinhamento de pareamento:

- Algoritmo FAST	ligado
- Tamanho de k-tupla	1
- Penalidade de gap	3
- Tamanho da janela	5
- Número de melhores diagonais	5

[0048] De maneira alternativa a identidade pode ser determinada de acordo com Chenna, Ramu, Sugawara, Hideaki, Koike, Tadashi, Lopez, Rodrigo, Gibson, Toby J, Higgins, Desmond G, Thompson, Julie D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. (2003) *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497-500, página da web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#> e as seguintes configurações:

- Penalidade por Abertura de Gap de DNA	15,0
- Penalidade de Extensão de Gap de DNA	6,66
- Matriz de DNA	Identidade
- Penalidade de Abertura de Gap de Proteína	10,0
- Penalidade por Extensão de Gap de Proteína	0,2
- Matriz de proteína	Gonnet
- Proteína/DNA ENDGAP	-1
- Proteína/DNA GAPDIST	4

[0049] A identidade de sequência entre o ácido nucleico ou proteína útil de acordo com a presente invenção e os ácidos nucleicos de MybTF ou proteínas de MybTF podem ser otimizados por comparação de sequência e algoritmos de alinhamento conhecidos na técnica (consulte Gribskov e Devereux, *Sequence Analysis Primer*, Stockton Press, 1991, e referências citadas a esse respeito) e calculando a diferença de percentual entre as sequências de nucleotídeos ou proteínas, por exemplo, por algoritmo de Smith-Waterman conforme implementado no programa de

computação BESTFIT com o uso de parâmetros padrão (por exemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group).

[0050] Uma “deleção” refere-se à remoção de um ou mais aminoácidos a partir de uma proteína ou à remoção de um ou mais ácidos nucleicos a partir de DNA, ssRNA e/ou dsRNA.

[0051] Uma “inserção” refere-se a um ou mais resíduos de aminoácidos ou resíduos de ácidos nucleicos a serem introduzidos em um local predeterminado em uma proteína ou no ácido nucleico.

[0052] Uma “substituição” refere-se à substituição de aminoácidos da proteína por outros aminoácidos que têm propriedades similares (como hidrofobicidade similar, hidrofiliabilidade, antigenicidade, propensão para formar ou quebrar estruturas α -helicoidais ou estruturas folha beta).

[0053] Ao nível de ácido nucleico, uma substituição refere-se a uma substituição de um ou mais nucleotídeos por outros nucleotídeos em um ácido nucleico, em que a proteína codificada pelo ácido nucleico modificado tem uma função similar. Em particular, homólogos de um ácido nucleico englobam substituições com base no código de aminoácidos degenerativos.

[0054] As substituições de aminoácidos são tipicamente de resíduos únicos, mas podem ser agrupadas dependendo das restrições funcionais colocadas na proteína e podem variar de 1 a 10 aminoácidos; inserções ou deleções serão usualmente na ordem de cerca de 1 a 10 resíduos de aminoácidos. As substituições de aminoácidos são preferencialmente substituições de aminoácidos conservativas. Tabelas de substituições conservativas são conhecidas na técnica (consulte, por exemplo, Taylor W.R. (1986) “The classification of amino acid conservation”, *J Theor Biol.*, 119:205-18 e Tabela 1 abaixo).

TABELA 1**EXEMPLOS DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS CONSERVADOS**

Resíduo	Substituições Conservativas		Resíduo	Substituições Conservativas
A	G, V, I, L, M		L	M, I, V, A, G
C	S, T		N	Q
E	D		Q	N
D	E		P	
G	A, V, I, L, M		S	T, C
F	Y, W		R	K, H
I	V, A, G, L, M		T	S, C
H	R, K		W	Y, F
K	R, H		V	I, A, G, L, M
M	L, I, V, A, G		Y	F, W

[0055] As substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos podem facilmente ser feitas com o uso de técnicas de síntese peptídica bem conhecidas na técnica, como síntese peptídica em fase sólida e similares, ou por manipulação de DNA recombinante.

[0056] Os métodos para a manipulação de sequências de DNA para produzir substituição, inserção ou deleção de variantes de uma proteína são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, técnicas para produzir mutações de substituição em locais predeterminados no DNA são bem conhecidas pelos técnicos no assunto e incluem a mutagenese M13, mutagenese do Gene T7 *in vitro* (USB, Cleveland, OH), mutagenese sítio-dirigida QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), PCR mediada por mutagenese sítio-dirigida ou outros protocolos de mutagenese sítio-dirigida.

[0057] Ortólogos e parálogos englobam conceitos evolutivos usados para descrever as relações ancestrais dos genes. Parálogos são genes da mesma espécie que foram originadas através de duplicação de um gene ancestral, ortólogos são genes de organismos diferentes que foram originados através de especiação, e também são derivados a partir de um gene ancestral comum.

[0058] Os termos “codificar” ou “que codifica” são usados para a capacidade de um ácido nucleico conter a informação para a sequência de aminoácidos de uma proteína através do código genético, isto é, a sucessão de cada códon sendo uma sequência de três nucleotídeos, a qual especifica quais aminoácidos seriam adicionados em seguida durante a síntese de proteína. Os termos “codifica” ou “que codifica” incluem, portanto, todos os quadros de leitura possíveis de um ácido nucleico. Além disso, os termos “codifica” ou “que codifica” também se aplica a um ácido nucleico, cuja sequência codificadora é interrompida por sequências de ácidos nucleicos não codificadoras, que são removidos antes da tradução, por exemplo, uma sequência de ácido nucleico que contém íntrons.

[0059] O termo “domínio” refere-se a um conjunto de aminoácidos conservados nas posições específicas ao longo de um alinhamento de sequências de proteínas relacionadas evolutivamente. Embora aminoácidos em outras posições possam variar entre homólogos, aminoácidos que são altamente conservados nas posições específicas indicam aminoácidos que provavelmente são essenciais na estrutura, estabilidade ou função de uma proteína.

[0060] Existem bancos de dados especializados na identificação de domínios, por exemplo, SMART (Schultz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5857-5864; Letunic *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res* 30, 242-244), InterPro (Mulder *et al.*, (2003) *Nucl. Acids. Res.* 31, 315-318), Prosite (Bucher e Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) *ISMB-94*; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., páginas 53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 32:D134-D137, (2004)), ou Pfam (Bateman *et al.*, *Nucleic Acids Research* 30(1): 276-280

(2002)). Um conjunto de ferramentas para análise *in silico* de sequências de proteínas está disponível no servidor proteômico ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger *et al.*, ExPASy: o servidor proteômico para conhecimento e análise em profundidade de proteínas, *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788(2003)). Domínios ou motivos também podem ser identificados com o uso de técnicas de rotina, como por alinhamento de sequência.

[0061] Como usado no presente pedido, os termos “resistência aos fungos”, “resistente a um fungo” e/ou “resistente a fungos” significa reduzir, prevenir ou retardar uma infecção por fungos. O termo “resistência” refere-se a resistência aos fungos. Resistência não implica que a planta necessariamente tenha 100% de resistência à infecção. Em realizações preferenciais, melhorar ou aumentar a resistência aos fungos significa que a resistência em uma planta resistente é maior que 10%, maior que 20%, maior que 30%, maior que 40%, maior que 50%, maior que 60%, maior que 70%, maior que 80%, maior que 90% ou maior que 95%, em comparação a uma planta tipo selvagem.

[0062] Como usado no presente pedido, os termos “resistência à ferrugem da soja”, “resistente a uma ferrugem da soja”, “resistente à ferrugem da soja”, “resistência à ferrugem”, “resistente a uma ferrugem” ou “resistente à ferrugem” significa reduzir, prevenir ou retardar uma infecção de uma planta, parte da planta ou célula vegetal por *Phacopsoraceae*, em particular *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomia* - também conhecida como ferrugem da soja ou ferrugem asiática da soja (ASR), em comparação a uma planta tipo selvagem, parte da planta tipo selvagem ou célula vegetal tipo selvagem. Resistência não implica que a planta necessariamente tenha 100% de resistência à infecção. Em realizações preferenciais, melhorar ou aumentar a resistência à ferrugem significa que a resistência à ferrugem em uma planta resistente é maior que 10%, maior que 20%, maior que 30%, maior que 40%, maior que 50%, maior que 60%, maior que 70%, maior que 80%, maior que

90% ou maior que 95%, em comparação a uma planta tipo selvagem que não é resistente à ferrugem da soja. Preferencialmente a planta tipo selvagem é uma planta de um genótipo similar, mais preferencialmente idêntica à planta que tem resistência aumentada à ferrugem da soja, mas não compreende um ácido nucleico exógeno de MybTF, fragmentos funcionais do mesmo e/ou um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar com um ácido nucleico de MybTF.

[0063] O nível de resistência aos fungos de uma planta pode ser determinado de várias maneiras, por exemplo, por pontuação/medição da área de folha infectada em relação à área de folha total. Outra possibilidade para determinar o nível de resistência é contar o número de colônias de ferrugem da soja sobre a planta ou medir a quantidade de esporos produzidos por essas colônias. Outra maneira de resolver o grau de infestação aos fungos é medir especificamente a quantidade de DNA da ferrugem por PCR quantitativo (q). Sondas específicas e sequências *primer* para a maioria dos patógenos fúngicos estão disponíveis na literatura (Frederick RD, Snyder CL, Peterson GL, *et al.* 2002 Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* *Phytopathology* 92(2) 217-227).

[0064] O termo “hibridização” como usado no presente pedido inclui “qualquer processo pelo qual uma fita de molécula de ácido nucleico se une a uma fita complementar através de pareamento de base” (J. Coombs (1994) *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, Nova York). A hibridização e a força de hibridização (isto é, a força da associação entre as moléculas de ácido nucleico) é afetada por esses fatores como o grau de complementaridade entre as moléculas de ácido nucleico, estringência das condições envolvidas, a T_m do híbrido formado, e a razão G:C dentro das moléculas de ácido nucleico.

[0065] Como usado no presente pedido, o termo “ T_m ” é usado em referência à “temperatura de fusão”. A temperatura de fusão é a temperatura

em que uma população de moléculas de ácido nucleico de fita dupla torna-se metade dissociada em fitas simples. A equação para calcular a T_m de moléculas de ácido nucleico é bem conhecida na técnica. Conforme indicado por referências padrão, uma estimativa simples do valor de T_m pode ser calculada pela equação: $T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ G+C})$, quando uma molécula de ácido nucleico está em solução aquosa em NaCl 1 M (consulte, por exemplo, Anderson e Young, *Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization* (1985)). Outras referências incluem cálculos mais sofisticados, que levam em conta características estruturais bem como de sequência para o cálculo de T_m . Condições estridentes, são conhecidas pelos técnicos no assunto e podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

[0066] Em particular, o termo “condições de estridência” refere-se a condições, em que 100 nucleotídeos contíguos ou mais, 150 nucleotídeos contíguos ou mais, 200 nucleotídeos contíguos ou mais ou 250 nucleotídeos contíguos ou mais que são um fragmento ou idêntico à molécula de ácido nucleico complementar (DNA, RNA, ssDNA ou ssRNA) hibridiza sob condições equivalentes a hibridização em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C com lavagem em SSC 2X, SDS 0,1% a 50°C ou 65°C, preferencialmente a 65°C, com uma molécula de ácido nucleico específica (DNA; RNA, ssDNA ou ssRNA). Preferencialmente, as condições de hibridização são equivalentes a hibridização em dodecil sulfato de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C com lavagem em SSC 1X, SDS 0,1% a 50°C ou 65°C, preferencialmente 65°C, mais preferencialmente as condições de hibridização são equivalentes a hibridização em dodecil sulfato de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C com lavagem em SSC 0,1X, SDS 0,1% a 50°C ou 65°C, preferencialmente 65°C. Preferencialmente, os nucleotídeos complementares hibridizam com um fragmento ou com os ácidos

nucleicos inteiros de MybTF. Alternativamente, condições de hibridização englobam hibridização a 65°C em 1x SSC ou a 42°C em 1x SSC e formamida 50%, seguido por lavagem a 65°C em 0,3x SSC ou hibridização a 50°C em 4x SSC ou a 40°C e, 6x SSC e formamida 50%, seguido por lavagem a 50°C em 2x SSC. Condições de hibridização ainda preferenciais são SDS 0,1%, SSD 0,1 e 65°C.

[0067] O termo “planta” tem a intenção de englobar plantas em qualquer estágio de maturidade ou desenvolvimento, bem como quaisquer tecidos ou órgãos (partes de planta) pegos ou derivados de qualquer uma dessas plantas a menos que claramente indicado de outra forma por contexto. As partes de planta incluem, mas não se limitam a, células vegetais, caules, raízes, flores, óvulos, estames, sementes, folhas, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, culturas de antera, gametófitos, esporófitos, pólen, microesporos, protoplastos, culturas de raízes cabeludas e/ou similares. A presente invenção também inclui sementes produzidas pelas plantas da presente invenção. Preferencialmente, as sementes compreendem os ácidos nucleicos de MybTF exógenos. Em uma realização, as sementes podem se desenvolver em plantas com resistência aumentada à infecção aos fungos em comparação a uma variedade tipo selvagem da semente da planta. Como usado no presente pedido, uma “célula vegetal” inclui, mas não se limita a, um protoplasto, gameta produzindo célula e uma célula que regenera em uma planta inteira. A cultura de tecido de vários tecidos de plantas e regeneração de plantas deste ponto em diante é bem conhecida na técnica e largamente é publicada.

[0068] A referência no presente pedido a um ácido nucleico e/ou proteína “endógena” da invenção refere-se ao ácido nucleico e/ou proteína em questão conforme encontrado em uma planta em sua forma natural (isto é, sem que haja qualquer intervenção humana).

[0069] O termo ácido nucleico “exógeno” refere-se a um ácido nucleico que foi introduzido em uma planta por meio de tecnologia genética. Um ácido nucleico “exógeno” pode tanto não ocorrer em uma planta em sua forma natural, ser diferente do ácido nucleico em questão conforme encontrado em uma planta em sua forma natural, como pode ser idêntico a um ácido nucleico encontrado em uma planta em sua forma natural, mas não integrado dentro de seu ambiente genético natural. O significado correspondente de “exógeno” é aplicado no contexto de expressão de proteína. Por exemplo, uma planta transgênica que contém um transgene, isto é, um ácido nucleico exógeno, pode, quando comparada à expressão do gene endógeno, encontrar um aumento substancial da expressão do respectivo gene ou proteína no total. Uma planta transgênica, de acordo com a presente invenção, inclui um ácido nucleico exógeno de MybTF integrado em quaisquer *loci* genéticos e opcionalmente a planta também pode incluir o gene endógeno dentro do antecedente genético natural.

[0070] Para os propósitos da invenção, meios “recombinantes” em relação a, por exemplo, uma sequência de ácido nucleico, uma molécula de ácido nucleico, um cassete de expressão ou uma construção de vetor que compreende qualquer um ou mais dos ácidos nucleicos de MybTF, todas essas construções produzidas pelo homem por métodos de tecnologia genética em que tanto:

- (a) as sequências dos ácidos nucleicos de MybTF ou uma parte das mesmas, ou
 - (b) a(s) sequência(s) de controle genético que (é)são ligada(s) de maneira funcional à sequência de ácido nucleico de MybTF de acordo com a invenção, por exemplo, um promotor, ou
 - (c) a) e b)
- não são localizadas em seu ambiente genético natural nem

foram modificadas pelo homem por métodos de tecnologia genética. A modificação pode assumir a forma de, por exemplo, uma substituição, adição, deleção, inversão ou inserção de um ou mais resíduos de nucleotídeo. O ambiente genético natural é entendido como significando o *locus* gênico ou cromossômico natural na planta original, ou a presença em uma biblioteca genômica ou a combinação com o promotor natural.

[0071] Por exemplo, um cassete de expressão que ocorre naturalmente, por exemplo, a combinação de ocorrência natural do promotor natural das sequências de ácidos nucleicos com a sequência de ácido nucleico correspondente que codifica uma proteína útil nos métodos da presente invenção, conforme definido acima, torna-se um cassete de expressão recombinante quando esse cassete de expressão é modificado pelo homem por métodos não naturais, sintéticos (“artificiais”) como, por exemplo, tratamento mutagênico. Métodos adequados são descritos, por exemplo, na patente US 5.565.350, documento WO 00/15815 ou patente US 200405323. Além disso, um cassete de expressão que ocorre naturalmente, por exemplo, a combinação de ocorrência natural do promotor natural das sequências de ácidos nucleicos com a sequência de ácido nucleico correspondente que codifica uma proteína útil nos métodos da presente invenção, conforme definido acima, torna-se um cassete de expressão recombinante quando esse cassete de expressão não está integrado no meio genético natural, mas em um meio genético diferente.

[0072] O termo “ácido nucleico isolado” ou “proteína isolada” refere-se a um ácido nucleico ou proteína que não está localizada em seu ambiente natural, em particular em seu ambiente celular natural. Dessa forma, um ácido nucleico isolado ou proteína isolada é essencialmente separada de outros componentes de seu ambiente natural. No entanto, o técnico no assunto está ciente de que preparações de um ácido nucleico isolado ou uma proteína

isolada pode exibir um certo grau de impureza dependendo do procedimento de isolamento usado. Métodos para de purificação de ácidos nucleicos e proteínas são bem conhecidos na técnica. O gene isolado pode ser isolado a partir de um organismo, ou pode ser fabricado artificialmente, por exemplo, por síntese química. Nesse aspecto, um ácido nucleico recombinante também pode estar em uma forma isolada.

[0073] Como usado no presente pedido, o termo “transgênico” refere-se a um organismo, por exemplo, uma planta, célula vegetal, calo, tecido vegetal ou parte de planta que contém de modo exógeno, o ácido nucleico, construção recombinante, vetor ou cassete de expressão descritos no presente pedido, ou uma parte dos mesmos, que é preferencialmente introduzido por processos biológicos não essenciais, preferencialmente, por transformação de *Agrobacteria*. A construção recombinante ou uma parte do mesmo é integrado de maneira estável em um cromossomo, de modo que é passado para gerações sucessivas por propagação clonal, propagação vegetativa ou propagação sexual. Gerações sucessivas preferenciais também são transgênicas. Processos essencialmente biológicos podem ser cruzamento de plantas e/ou recombinação natural.

[0074] Uma planta transgênica, células vegetais ou tecidos para os propósitos da invenção são assim entendidos como significando que um ácido nucleico de MybTF exógeno, construção recombinante, vetor ou cassete de expressão incluindo um ou mais ácidos nucleicos de MybTF são integrados no genoma por meios de tecnologia genética.

[0075] Uma planta “tipo selvagem”, parte da planta “tipo selvagem” ou célula vegetal “tipo selvagem” significa que a dita planta, parte da planta ou célula vegetal não expressam ácido nucleico exógeno de MybTF ou proteína exógena MybTF.

[0076] *Locus* natural significa a localização em um cromossomo

específico, preferencialmente a localização entre certos genes, mais preferencialmente a mesma sequência antecedente como na planta original que é transformada.

[0077] Preferencialmente, a planta transgênica, célula vegetal ou tecido da mesma expressam os ácidos nucleicos de MybTF, constructos de MybTF ou cassetes de expressão de MybTF descritos no presente pedido.

[0078] O termo “expressão” ou “expressão gênica” significa a transcrição de um gene específico, genes específicos ou construção de vetor genético específico. O termo “expressão” ou “expressão gênica”, em particular, significa a transcrição de um gene ou genes, ou construção de vetor genético dentro do RNA estrutural (rRNA, tRNA) ou mRNA, com ou sem subsequente tradução deste último dentro de uma proteína. O processo inclui a transcrição de DNA e processamento do produto de RNA resultante. O termo “expressão” ou “expressão gênica” também pode incluir a tradução do mRNA e com isso a síntese da proteína codificada, isto é, expressão de proteína.

[0079] O termo “expressão aumentada”, “expressão melhorada”, “superexpressão” ou “aumento de conteúdo” como usado no presente pedido, significa qualquer forma de expressão que é adicional ao nível de expressão tipo selvagem original. Para os propósitos desta invenção, o nível de expressão tipo selvagem original também pode ser zero (ausência de expressão).

[0080] Métodos para aumentar a expressão de genes ou produtos gênicos são bem documentados na técnica e incluem, por exemplo, superexpressão dirigida pelos promotores apropriados, o uso de *enhancers* de transcrição ou *enhancers* de tradução. Ácidos nucleicos isolados que servem como promotores ou elementos *enhancer* podem ser introduzidos na posição apropriada (tipicamente a montante) de uma forma não heteróloga de um polinucleotídeo de modo a suprarregular a expressão de um ácido nucleico que codifica a proteína de interesse. Por exemplo, os promotores endógenos

podem ser alterados *in vivo* por mutação, deleção e/ou substituição (consulte, Kmiec, patente US 5.565.350; Zarling *et al.*, documento WO 9322443), ou promotores isolados podem ser introduzidos em uma célula vegetal na orientação apropriada e distância a partir de um gene da presente invenção, de modo a controlar a expressão do gene.

[0081] O termo “fragmento funcional” refere-se a qualquer ácido nucleico ou proteína que meramente compreende uma parte do ácido nucleico inteiro ou proteína inteira, respectivamente, mas ainda fornece a mesma função, por exemplo, resistência aos fungos, quando expresso ou reprimido em uma planta, respectivamente. Preferencialmente, o fragmento compreende pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% da sequência original. Preferencialmente, o fragmento funcional compreende ácidos nucleicos ou aminoácidos contíguos como no ácido nucleico original ou proteína original, respectivamente. Em uma realização, os fragmentos de quaisquer ácidos nucleicos de MybTF têm uma identidade conforme definido acima ao longo de um comprimento de pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 90% dos nucleotídeos do respectivo ácido nucleico de MybTF.

[0082] O termo “variante de *splice*”, como usado no presente pedido, engloba variantes de uma sequência de ácidos nucleicos na qual íntrons e/ou éxons ou partes dos mesmos foram removidos, substituídos, deslocados e/ou adicionados, ou na qual os íntrons foram encurtados ou alongados. Dessa forma, uma variante de *splice* pode ter um ou mais, ou até todos os íntrons removidos, adicionados ou parcialmente removidos ou parcialmente adicionados. De acordo com essa definição, o cDNA é considerado como uma variante de *splice* das respectivas sequências genômicas contendo íntron e vice-versa. Essas variantes de *splice* podem ser encontradas na natureza ou podem ser fabricadas artificialmente. Os métodos

para prever e isolar essas variantes de *splice* são bem conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, Foissac e Schiex (2005) *BMC Bioinformatics* 6: 25).

[0083] Nos casos onde é desejado superexpressão de ácido nucleico, o termo “atividade funcional similar” ou “função similar” significa que qualquer homólogo e/ou fragmento fornece resistência aos fungos quando expresso em uma planta. Preferencialmente, atividade funcional similar significa que pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% ou resistência aos fungos mais alta em comparação com a atividade funcional fornecida pela expressão exógena da sequência de nucleotídeo de MybTF conforme definido pela SEQ ID NO: 6, 4, 2, 3 ou 1.

[0084] O termo “atividade aumentada” ou “atividade melhorada”, como usado no presente pedido significa qualquer proteína que tem atividade aumentada e que fornece uma resistência aos fungos aumentada em comparação à planta tipo selvagem que expressa somente o respectivo ácido nucleico de MybTF endógeno. No que se refere à superexpressão, para os propósitos desta invenção, o nível de expressão tipo selvagem original também pode ser zero (ausência de expressão).

[0085] Em relação a uma construção de vetor e/ou moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, o termo “ligado de maneira funcional” entende-se significar que o ácido nucleico a ser expresso é ligado à sequência reguladora, incluindo promotores, terminadores, *enhancers* e/ou outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação), de uma maneira que permita expressão do ácido nucleico (por exemplo, em uma célula vegetal hospedeira quando o vetor é introduzido na célula vegetal hospedeira). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) e Gruber e Crosby, em: *Methods in*

Plant Molecular Biology and Biotechnology, Eds. Glick e Thompson, Capítulo 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Flórida, incluindo as referências a esse respeito. Sequências reguladoras incluem as que direcionam expressão constitutiva de uma sequência de nucleotídeos em muitos tipos de células hospedeiras e as que direcionam expressão direta da sequência de nucleotídeos somente em certas células hospedeiras ou sob certas condições. Será apreciado pelo técnico no assunto que o projeto do vetor pode depender desses fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de ácido nucleico desejado, e similares.

[0086] O termo “introdução” ou “transformação”, conforme mencionado no presente pedido, engloba a transferência de um polinucleotídeo exógeno em uma célula hospedeira, independentemente do método usado para a transferência. O tecido vegetal capaz de propagação clonal subsequente, tanto por organogênese como por embriogênese, pode ser transformado por uma construção de vetor da presente invenção e regenerar uma planta inteira a partir dele. O tecido específico escolhido varia de acordo com os sistemas de propagação clonal disponíveis e mais adequados à espécie particular sendo transformada. Tecido exemplares alvos incluem discos foliares, pólen, embriões, cotilédones, hipocótilos, megagametófitos, tecido caloso, tecido merismático existente (por exemplo, meristema apical, gemas axilares e meristemas de raiz), e tecido de meristema induzido (por exemplo, meristema de cotilédone e meristema de hipocótilo). O polinucleotídeo pode ser introduzido de maneira transitória ou estável em uma célula hospedeira e pode ser mantido não integrado, por exemplo, como um plasmídeo. De maneira alternativa, ele pode ser integrado no genoma hospedeiro. O genoma hospedeiro inclui o ácido nucleico contido no núcleo bem como o ácido nucleico contido nos plastídeos, por exemplo, cloroplastos e/ou mitocôndria. A célula vegetal transformada resultante pode então ser

usada para regenerar uma planta transformada de uma maneira conhecida por técnicos no assunto.

[0087] O termo “terminador” engloba uma sequência de controle que é uma sequência de DNA no final de uma unidade de transcrição que sinaliza o processamento 3’ e poliadenilação de um transcrito primário e terminação da transcrição. O terminador pode ser derivado do gene natural, a partir de uma variedade de outros genes de plantas, ou a partir do T-DNA. O terminador a ser adicionado pode ser derivado, por exemplo, dos genes da nopalina sintase ou octopina sintase, ou alternativamente de outro gene de planta, ou menos preferencialmente de qualquer outro gene de eucarionte.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

ÁCIDOS NUCLEICOS DE MYBTF

[0088] O ácido nucleico de MybTF a ser superexpresso, a fim de alcançar uma resistência aumentada para patógenos fúngicos, por exemplo, da Família Phacopsoraceae, por exemplo, ferrugem da soja, é preferencialmente um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF, preferencialmente da Família R2R3-MYB, e é preferencialmente conforme definido pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento, homólogo, derivado, ortólogo ou parálogo da mesma, ou uma variante de *splice* da mesma. Preferencialmente, o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou é um fragmento funcional da mesma, ou uma variante de *splice* da mesma. Da máxima preferência tem pelo menos 90% de identidade, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, mais preferencialmente

tem pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55.

[0089] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF a ser superexpresso, a fim de alcançar uma resistência aumentada para patógenos fúngicos, por exemplo, da Família *Phacopsoraceae*, por exemplo, ferrugem da soja, é preferencialmente um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF, e é preferencialmente conforme definido pela SEQ ID NO: 2, ou um fragmento, homólogo, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo. Preferencialmente, o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 ou é um fragmento funcional do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo. Da máxima preferência tem pelo menos 90% de identidade, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% de identidade, mais preferencialmente tem pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com a SEQ ID NO: 2.

[0090] Mais preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF a ser superexpresso, a fim de alcançar uma resistência aumentada para patógenos fúngicos, por exemplo, da Família *Phacopsoraceae*, por exemplo, ferrugem da soja, é preferencialmente um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF, e é preferencialmente conforme definido pela SEQ ID NO: 1, ou um fragmento, homólogo, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo. Preferencialmente, o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência,

ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1 ou é um fragmento funcional do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo. Da máxima preferência tem pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% de identidade, mais preferencialmente tem pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com a SEQ ID NO: 1.

[0091] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF a ser superexpresso, a fim de alcançar uma resistência aumentada para patógenos fúngicos, por exemplo, da Família *Phacopsoraceae*, por exemplo, ferrugem da soja, é preferencialmente um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF, e é preferencialmente conforme definido pela SEQ ID NO: 3, ou um fragmento, homólogo, derivado, ortólogo ou parólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo. Preferencialmente, o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3 ou é um fragmento funcional do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo. Da máxima preferência tem pelo menos 90% de identidade, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% de identidade, mais preferencialmente tem pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com a SEQ ID NO: 3.

[0092] Preferencialmente, o ácido nucleico MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que consiste em ou compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos

86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo da mesma, ou uma variante de *splice* da mesma;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que compreende uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6 ou 4; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estridência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades

essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5 ou 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[0093] Preferencialmente, o ácido nucleico MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que consiste em ou compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 1 ou 8, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos

93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7 ou 5, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 1 ou 8, preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estringência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[0094] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos

86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2 ou 3, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7 ou 5, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 2 ou 3, preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estringência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos

melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[0095] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2 ou 6, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à

sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 2 ou 6, preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estridência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[0096] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo

menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 3 ou 4, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 5, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 3 ou 4, preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta stringência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF

como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[0097] As porcentagens de identidade de um ácido nucleico são indicadas com referência à região inteira de nucleotídeo fornecida em uma sequência especificamente divulgada no presente pedido.

[0098] Preferencialmente, a porção do ácido nucleico de MybTF é de cerca de 500 a 600, cerca de 600 a 700, cerca de 800 a 900, cerca de 900 a 1000, cerca de 1000 a 1100, cerca de 1100 a 1200, cerca de 1200 a 1300, ou cerca de 1300 a 1340 nucleotídeos, preferencialmente nucleotídeos consecutivos, preferencialmente contados a partir da terminação 5' ou 3' do ácido nucleico, em comprimento, das sequências de ácidos nucleicos determinadas na SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55.

[0099] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF compreende pelo menos cerca de 500, pelo menos cerca de 600, pelo menos cerca de 700, pelo menos cerca de 800, pelo menos cerca de 900, pelo menos cerca de 1100, pelo menos cerca de 1200 ou pelo menos cerca de 1300 nucleotídeos, preferencialmente nucleotídeos contínuos, preferencialmente contados a partir das extremidades 5' ou 3' do ácido nucleico, ou até o comprimento total da sequência de ácido nucleico especificada na SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55.

[00100] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF compreende pelo menos cerca de 500, pelo menos cerca de 550, pelo menos cerca de 600, pelo menos cerca de 650, pelo menos cerca de 700, pelo menos cerca de 750, pelo menos cerca de 800, pelo menos cerca de 850 ou pelo menos cerca de 900 nucleotídeos, preferencialmente nucleotídeos contínuos, preferencialmente contados a partir das extremidades 5' ou 3' do ácido

nucleico, ou até o comprimento total da sequência de ácido nucleico especificada na SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55.

[00101] Preferencialmente, a porção do ácido nucleico de MybTF é de cerca de 500 a 550, cerca de 550 a 600, cerca de 600 a 650, cerca de 650 a 700, cerca de 675 a 708, cerca de 700 a 750, cerca de 750 a 800, cerca de 800 a 850, cerca de 850 a 900, cerca de 900 a 918 nucleotídeos, preferencialmente nucleotídeos consecutivos, preferencialmente contados a partir da terminação 5' ou 3' do ácido nucleico, em comprimento, das sequência de ácidos nucleicos determinadas na SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55.

[00102] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF compreende pelo menos cerca de 500, pelo menos cerca de 550, pelo menos cerca de 600, pelo menos cerca de 650, pelo menos cerca de 700, pelo menos cerca de 750, pelo menos cerca de 800, pelo menos cerca de 850 ou pelo menos cerca de 900 nucleotídeos, preferencialmente nucleotídeos contínuos, preferencialmente contados a partir das extremidades 5' ou 3' do ácido nucleico, ou até o comprimento total da sequência de ácido nucleico especificada na SEQ ID NO: 2 ou 3.

[00103] Preferencialmente, a porção do ácido nucleico de MybTF é de cerca de 500 a 550, cerca de 550 a 600, cerca de 600 a 650, cerca de 650 a 700, cerca de 675 a 708, cerca de 700 a 750, cerca de 750 a 800, cerca de 800 a 850, cerca de 850 a 900, cerca de 900 a 918 nucleotídeos, preferencialmente nucleotídeos consecutivos, preferencialmente contados a partir da terminação 5' ou 3' do ácido nucleico, em comprimento, das sequência de ácidos nucleicos determinadas na SEQ ID NO: 2 ou 3.

[00104] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma variante de *splice* de ácido nucleico de MybTF. As variantes de *splice*

preferenciais são variantes de *splice* de um ácido nucleico representado pela SEQ ID NO: 1 ou 8. Preferencialmente, os ácidos nucleicos de MybTF sendo uma variante de *splice* de SEQ ID NO: 1 ou 8 são mostrados na Figura 3.

[00105] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma variante de “*splice*” de SEQ ID NO: 1 ou 8, em que a variante de *splice* é selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 4 ou 6, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7 ou 5, ou um

fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 1, 6 ou 4; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estridência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00106] Variantes de *splice* preferenciais de SEQ ID NO: 1 ou 8 consiste ou compreende qualquer uma das sequências de nucleotídeos mostradas na SEQ ID NO: 4 ou 6. Com a máxima preferência é a variante de *splice* de ácido nucleico de MybTF conforme mostrado na SEQ ID: 6.

[00107] Preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo

menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 1 ou 8, ou uma variante de *splice* da mesma;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) sob condições de hibridização de alta estridência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iii) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (ii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (ii) acima devido à degeneração do código genético;

- em que a variante de *splice* é selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos

99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 4 ou 6, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7 ou 5, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 1, 6 ou 4; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta stringência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos

nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00108] Mais preferencialmente, o ácido nucleico de MybTF é uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

- um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 1 ou 8, ou uma variante de *splice* da mesma;

- em que a variante de *splice* é selecionada a partir do grupo que consiste em:

- um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 4 ou 6, preferencialmente SEQ ID NO: 4.

[00109] Todas as sequências de ácidos nucleicos mencionadas no presente pedido (sequências de DNA e RNA de fita simples e fita dupla, por exemplo, cDNA e mRNA) podem ser produzidas de uma maneira conhecida por síntese química a partir dos blocos de construção de nucleotídeos, por exemplo, por condensação de fragmento de sobreposição individual, blocos de

construção de ácido nucleico complementar da dupla hélice. A síntese química de oligonucleotídeos pode, por exemplo, ser realizada de uma maneira conhecida, pelo método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edição, Wiley Press, Nova York, páginas 896-897). O acúmulo de oligonucleotídeos sintéticos e preenchimento de *gaps* por meio do fragmento de Klenow da DNA polimerase e reações de ligação bem como técnicas de clonagem geral são descritas em Sambrook *et al.* (1989), consulte abaixo.

[00110] Os ácidos nucleicos de MybTF descritos no presente pedido são úteis nos constructos, métodos, plantas, partes coletáveis e produtos da invenção.

PROTEÍNAS MYBTF

[00111] A proteína MybTF é preferencialmente da Família R2R3-MYB, preferencialmente definida pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento, homólogo, derivado, ortólogo ou parálogo da mesma; Preferencialmente, a proteína MybTF da presente invenção é codificada por um ácido nucleico, que tem pelo menos 70% de identidade, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9-24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo. Mais preferencialmente, a proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou é um fragmento funcional da mesma, um ortólogo ou um parálogo da mesma; Da máxima preferência tem pelo menos 90% de identidade, pelo menos 92%, pelo

menos 95%, pelo menos 97% de identidade, mais preferencialmente tem pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00112] Mais preferencialmente, a proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou é um fragmento funcional da mesma, um ortólogo ou um parálogo da mesma.

[00113] Mais preferencialmente, a proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 5, ou é um fragmento funcional da mesma, um ortólogo ou um parálogo da mesma.

[00114] A proteína MybTF é preferencialmente definida pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento, homólogo, derivado, ortólogo ou parálogo da mesma; Preferencialmente, a proteína MybTF da presente invenção é codificada por um ácido nucleico, que tem pelo menos 70% de identidade, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9-24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo. Mais preferencialmente, a proteína MybTF da presente invenção tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de

sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou é um fragmento funcional da mesma, um ortólogo ou um parálogo da mesma; Da máxima preferência tem pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% de identidade, mais preferencialmente tem pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00115] Preferencialmente, a proteína MybTF é uma proteína que consiste em ou compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6 ou 4; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; ou

(ii) uma sequência de aminoácidos codificada por um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos

75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle.

[00116] Preferencialmente, a proteína MybTF é uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 2, 6 ou 1; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

ou

(ii) uma sequência de aminoácidos codificada por um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2, 6, 9 a 16 ou 1, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle.

[00117] Preferencialmente, a proteína MybTF é uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 5, ou um fragmento funcional,

derivado, ortólogo ou parólogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 3, 4 ou 1; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; ou

(ii) uma sequência de aminoácidos codificada por um ácido nucleico que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 3, 4, 17 a 24 ou 1, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle.

[00118] Uma derivada preferencial de uma proteína MybTF é uma proteína MybTF que consiste em ou que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

- uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos

90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56,

- em que os resíduos de aminoácidos não idênticos são substituições de aminoácidos conservativas, preferencialmente conforme mostrado na Tabela 1 do resíduo de aminoácido correspondente de SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que a da SEQ ID NO: 7 ou 5, ou que a proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6 ou 4, preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle.

[00119] Preferencialmente, a proteína MybTF consiste em ou compreende uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56 com uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas, preferencialmente conforme mostrado na Tabela 1 dos resíduos de aminoácidos correspondentes de SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56. Preferencialmente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 1 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 60 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 210 ou 210 a 220 resíduos de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56 são substituições de aminoácidos conservativas, preferencialmente conforme mostrado na Tabela 1 do resíduo de aminoácido correspondente de SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32,

34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00120] Mais preferencialmente, a proteína MybTF consiste em ou compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos conforme representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, em que pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 28, pelo menos 29, pelo menos 30, pelo menos 35, pelo menos 40, pelo menos 45, pelo menos 50, pelo menos 55, pelo menos 60, pelo menos 65, pelo menos 70, pelo menos 75, pelo menos 80, pelo menos 85, pelo menos 90, pelo menos 95, pelo menos 100, pelo menos 105, pelo menos 110, pelo menos 115 ou pelo menos 120 dos resíduos de aminoácidos não idênticos, ou em que 1 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 210, ou 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 60 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 210 ou 210 a 220 ou mesmo todos os resíduos de aminoácidos não idênticos são substituições conservativas de aminoácidos, preferencialmente conforme mostrado na Tabela 1 do resíduo de aminoácido correspondente de SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00121] As porcentagens de identidade de um polipeptídeo ou proteína são indicadas com referência à sequência inteira de aminoácidos especificamente divulgados no presente pedido.

[00122] Preferencialmente, a proteína MybTF compreende pelo

menos cerca de 100, pelo menos cerca de 150, pelo menos cerca de 200, pelo menos cerca de 225, pelo menos cerca de 250, pelo menos cerca de 275 ou pelo menos cerca de 300 resíduos de aminoácidos, preferencialmente resíduos de aminoácidos contínuos, preferencialmente contados a partir da terminação N ou da terminação C da sequência de aminoácidos, ou até o comprimento total da sequência de aminoácidos especificada na SEQ ID NO: 5, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00123] Preferencialmente, o polipeptídeo MybTF compreende cerca de 100 a 150, cerca de 150 a 200, cerca de 200 a 225, cerca de 225 a 250, cerca de 250 a 275, cerca de 275 a 300 ou cerca de 300 a 305 resíduos de aminoácidos, preferencialmente resíduos de aminoácidos consecutivos, preferencialmente contados a partir da terminação N ou da terminação C da sequência de aminoácidos, ou até o comprimento total de qualquer uma das sequências de aminoácidos codificadas pelas sequências de ácidos nucleicos especificadas na SEQ ID NO: 5, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00124] Preferencialmente, a proteína MybTF compreende pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 125, pelo menos cerca de 150, pelo menos cerca de 175, pelo menos cerca de 200 ou pelo menos cerca de 225 resíduos de aminoácidos, preferencialmente resíduos de aminoácidos contínuos, preferencialmente contados a partir da terminação N ou da terminação C da sequência de aminoácidos, ou até o comprimento total da sequência de aminoácidos especificada na SEQ ID NO: 7, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ou 40.

[00125] Preferencialmente, o polipeptídeo MybTF compreende cerca de 100 a 125, cerca de 125 a 150, cerca de 150 a 175, cerca de 175 a 200, cerca de 200 a 225 ou cerca de 225 a 233 resíduos de aminoácidos, preferencialmente resíduos de aminoácidos consecutivos, preferencialmente contados a partir da terminação N ou da terminação C da sequência de

aminoácidos, ou até o comprimento total de qualquer uma das sequências de aminoácidos codificadas pelas sequências de ácidos nucleicos especificadas na SEQ ID NO: 7, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ou 40.

[00126] As proteínas MybTF descritas no presente pedido são úteis nos constructos, métodos, plantas, partes coletáveis e produtos da invenção.

MÉTODOS PARA AUMENTAR RESISTÊNCIA AOS FUNGOS; MÉTODOS PARA MODULAR EXPRESSÃO GÊNICA

[00127] Uma realização da invenção é um método para aumentar resistência aos fungos, preferencialmente resistência a Phacopsoracea, por exemplo, ferrugem da soja, em uma planta, parte da planta ou célula vegetal, aumentando a expressão de uma proteína MybTF ou de um fragmento funcional, ortólogo, parálogo ou homólogo do mesmo em comparação a plantas tipo selvagem, partes da planta tipo selvagem ou células vegetais tipo selvagem.

[00128] A presente invenção também fornece um método para aumentar resistência a patógenos fúngicos, em particular um patógeno heminecrotrofico, em particular patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales), preferencialmente patógenos fúngicos da Família Phacopsoraceae, preferencialmente contra patógenos fúngicos do gênero *Phacopsora*, com a máxima preferência contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecido como ferrugem da soja em plantas ou células vegetais, em que em comparação a plantas tipo selvagem, partes da planta tipo selvagem ou células vegetais tipo selvagem uma proteína MybTF é superexpressa.

[00129] A presente invenção ainda fornece um método para aumentar a resistência a patógenos fúngicos do gênero *Phacopsora*, com a máxima preferência contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*,

também conhecido como ferrugem da soja em plantas ou células vegetais por superexpressão de uma proteína MybTF.

[00130] Em realizações preferenciais, a quantidade de proteína e/ou função da proteína MybTF na planta é aumentada por pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou mais em comparação com uma planta tipo selvagem que não é transformada com o ácido nucleico de MybTF.

[00131] Em uma realização da invenção, a proteína MybTF é codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 75%, mais preferencialmente pelo menos 80%, por exemplo, pelo menos 85%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95% ou pelo menos 96% ou pelo menos 97% ou pelo menos 98% com a máxima preferência 99% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo; ou por

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 75%, mais preferencialmente pelo menos 80%, por exemplo, pelo menos 85%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95% ou pelo menos 96% ou pelo menos 97% ou pelo menos 98% com a máxima preferência 99% de homologia com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00132] Um método para aumentar resistência aos fungos, preferencialmente resistência à Phacopsoracea, por exemplo, ferrugem da soja, em uma planta, parte da planta ou célula vegetal, aumentando a expressão de uma proteína MybTF ou de um fragmento funcional, ortólogo, parólogo ou homólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo, em que a proteína MybTF é codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100%

de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético;

- ser uma realização adicional da invenção.

[00133] Um método para aumentar resistência aos fungos, preferencialmente resistência a Phacopsoracea, por exemplo, ferrugem da soja, em uma planta, parte da planta ou célula vegetal, aumentando a expressão de uma proteína MybTF ou de um fragmento funcional, ortólogo, parálogo ou homólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo, em que a proteína MybTF é codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(i) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 5, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético

- ser uma realização adicional da invenção.

[00134] Um método para aumentar resistência aos fungos, preferencialmente resistência a Phacopsoracea, por exemplo, ferrugem da soja, em uma planta, parte da planta ou célula vegetal, aumentando a expressão de uma proteína MybTF ou de um fragmento funcional, ortólogo, parálogo ou homólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo, em que a proteína MybTF é codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100%

de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 ou 6, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(i) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético;

- ser uma realização adicional da invenção.

[00135] Um método para aumentar resistência aos fungos, preferencialmente resistência a Phacopsoracea, por exemplo, ferrugem da soja, em uma planta, parte da planta ou célula vegetal, aumentando a expressão de uma proteína MybTF ou de um fragmento funcional, ortólogo, parálogo ou homólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo, em que a proteína MybTF é codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3 ou 4, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(i) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 5, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético;

- ser uma realização adicional da invenção.

[00136] Em um método adicional da invenção, o método compreende as etapas de:

(a) transformar de maneira estável uma célula vegetal com um

cassete de expressão recombinante que compreende:

(i) um ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica o mesmo polipeptídeo MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- em ligação funcional com um promotor;

(b) regenerar a planta a partir da célula vegetal; e

(c) expressar o dito ácido nucleico, opcionalmente em que o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF é expresso em uma quantidade e por um período suficiente para gerar ou para aumentar a resistência à ferrugem da soja na dita planta.

[00137] Preferencialmente, o método compreende as etapas de:

(a) transformar de maneira estável uma célula vegetal com um cassete de expressão recombinante que compreende:

(i) um ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo.

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 5, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de

controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica o mesmo polipeptídeo MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- em ligação funcional com um promotor;

(b) regenerar a planta a partir da célula vegetal; e

(c) expressar o dito ácido nucleico, opcionalmente em que o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF é expresso em uma quantidade e por um período suficiente para gerar ou para aumentar a resistência à ferrugem da soja na dita planta.

[00138] Preferencialmente, o método compreende as etapas de:

(a) transformar de maneira estável uma célula vegetal com um cassete de expressão recombinante que compreende:

(i) um ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 ou 6, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estritas com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos

nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica o mesmo polipeptídeo MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- em ligação funcional com um promotor;

(b) regenerar a planta a partir da célula vegetal; e

(c) expressar o dito ácido nucleico, opcionalmente em que o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF é expresso em uma quantidade e por um período suficiente para gerar ou para aumentar a resistência à ferrugem da soja na dita planta.

[00139] Preferencialmente, o método compreende as etapas de:

(a) transformar de maneira estável uma célula vegetal com um cassete de expressão recombinante que compreende:

(i) um ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3 ou 4, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 5, um

fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica o mesmo polipeptídeo MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- em ligação funcional com um promotor;

(b) regenerar a planta a partir da célula vegetal; e

(c) expressar o dito ácido nucleico, opcionalmente em que o ácido nucleico que codifica uma proteína MybTF é expresso em uma quantidade e por um período suficiente para gerar ou para aumentar a resistência à ferrugem da soja na dita planta.

[00140] Preferencialmente, o promotor é um promotor induzido por ferrugem e/ou mesófilo-específico, preferencialmente o promotor 820 mesófilo-específico induzido por ferrugem.

[00141] Preferencialmente, o método para aumentar a resistência aos fungos, preferencialmente resistência à *Phacopsoracea*, por exemplo, ferrugem da soja, em uma planta, parte da planta, ou célula vegetal compreende ainda a etapa de seleção de uma planta transgênica que expressa:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parólogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estritas uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica o mesmo polipeptídeo MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00142] Uma realização preferencial é um método para aumentar a resistência à ferrugem da soja em uma planta de soja, parte da planta de soja

ou célula vegetal de soja, por aumento da expressão de uma proteína MybTF , em que a proteína MybTF é codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- em que o aumento da expressão da proteína MybTF é alcançado por transformação da planta de soja, parte da planta ou célula vegetal com um ácido nucleico que compreende o ácido nucleico especificado

no item (i) ou (iii) ou (iii) ou (iv).

[00143] Além disso, uma realização preferencial é um método para aumentar a resistência à ferrugem da soja em uma planta de soja, parte da planta de soja ou célula vegetal de soja, por aumento da expressão de uma proteína MybTF, em que a proteína MybTF é codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; ou

(iii) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (ii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (ii) acima devido à degeneração do código genético,

- em que o aumento da expressão da proteína MybTF é alcançado por transformação da planta de soja, parte da planta ou célula vegetal com um ácido nucleico que compreende o ácido nucleico especificado no item (i), (ii) ou (iii).

[00144] Os patógenos fúngicos ou patógenos similares a fungos (como, por exemplo, Chromista) podem pertencer ao grupo que compreende Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomycetes,

Zygomycetes, Basidiomycota ou Deuteromycetes (Fungos imperfeitos). Os agentes patogênicos que podem ser mencionados a título de exemplo, mas não de limitação, são os detalhados nas Tabelas 2 e 3, e as doenças que estão associadas a eles.

TABELA 2**DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS BIOTRÓFICOS E/OU****HEMINECROTRÓFICOS**

Doença	Patógeno
Ferrugem da folha	<i>Puccinia recondita</i>
Ferrugem amarela	<i>P. striiformis</i>
Míldio	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Ferrugem (milho comum)	<i>Puccinia sorghi</i>
Ferrugem (milho do Sul)	<i>Puccinia polysora</i>
Manchas das folhas do Tabaco	<i>Cercospora nicotianae</i>
Ferrugem (soja)	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> , <i>P. meibomia</i>
Ferrugem (milho tropical)	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>

TABELA 3**DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS NECROTRÓFICOS E/OU HEMIBIOTRÓFICOS E****OOMICETOS**

Doença	Patógeno
Mancha plumosa	<i>Septoria (Stagonospora) nodorum</i>
Mancha foliar	<i>Septoria tritici</i>
Fusariose da espiga	<i>Fusarium</i> spp.
Requeima (<i>late blight</i>)	<i>Phytophthora infestans</i>
Antracnose de	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorfo: <i>Glomerella</i>)

Doença	Patógeno
crestamento da folha Antracnose de apodrecimento do talo	<i>graminicola</i> Politis); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorfo: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
Mancha foliar de Curvularia	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> , = <i>C. maculans</i> (teleomorfo: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia</i> <i>inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorfo: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorfo: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia</i> <i>pallens</i> (teleomorfo: <i>Cochliobolus pallens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorfo: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
Mancha foliar de Didymella	<i>Didymella exilis</i>
Mancha foliar ou listras foliares de Diplodi	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia leaf</i> <i>macrospora</i>
Míldio de manchas marrons	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Míldio de pendão louco (crazy top)	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora</i> <i>macrospora</i>
Míldio de espiga verde (míldio graminicola)	<i>Sclerospora graminicola</i>
Manchas das folhas, secundárias	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta maydis</i> , <i>A. tritici</i> , <i>A.</i> <i>zeicola</i> , <i>Bipolaris victoriae</i> = <i>Helminthosporium</i> <i>victoriae</i> (teleomorfo: <i>Cochliobolus victoriae</i>), <i>C.</i> <i>sativus</i> (anamorfo: <i>Bipolaris sorokiniana</i> = <i>H.</i> <i>sorokinianum</i> = <i>H. sativum</i>), <i>Epicothium nigrum</i> ,

Doença	Patógeno
	<i>Exserohilum prolatum</i> = <i>Drechslera prolata</i> (teleomorfo: <i>Setosphaeria prolata</i>) <i>Graphium penicillioides</i> , <i>Leptosphaeria maydis</i> , <i>Leptothyrium zaeae</i> , <i>Ophiosphaerella herpotricha</i> , (anamorfo: <i>Scolecosporiella</i> sp.), <i>Paraphaeosphaeria michotii</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Septoria zaeae</i> , <i>S. zeicola</i> , <i>S. zeina</i>
Crestamento foliar de milho do Norte (<i>white blast</i> , podridão do talo e da coroa (<i>crown stalk rot</i>), listras)	<i>Setosphaeria turcica</i> (anamorfo: <i>Exserohilum turcicum</i> = <i>Helminthosporium turcicum</i>)
Mancha foliar do milho do Norte, Podridão da espiga de <i>Helminthosporium</i> (raça 1)	<i>Cochliobolus carbonum</i> (anamorfo: <i>Bipolaris zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i>)
Mancha foliar de <i>Phaeosphaeria</i>	<i>Phaeosphaeria maydis</i> = <i>Sphaerulina maydis</i>
Mancha foliar de <i>Rostratum</i> (doença foliar de <i>Helminthosporium</i> , apodrecimento da espiga e talo)	<i>Setosphaeria rostrata</i> , (anamorfo: <i>Xserohilum rostratum</i> = <i>Helminthosporium rostratum</i>)
Míldio de Java	<i>Peronosclerospora maydis</i> = <i>Sclerospora maydis</i>
Míldio das Filipinas	<i>Peronosclerospora philippinensis</i> = <i>Sclerospora philippinensis</i>

Doença	Patógeno
Míldio do sorgo	<i>Peronosclerospora sorghi</i> = <i>Sclerospora sorghi</i>
Míldio de Spontaneum	<i>Peronosclerospora spontanea</i> = <i>Sclerospora spontanea</i>
Míldio da cana-de-açúcar	<i>Peronosclerospora sacchari</i> = <i>Sclerospora sacchari</i>
Apodrecimento da espiga de Sclerotium (crestamento do Sul)	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (teleomorfo: <i>Athelia rolfsii</i>)
Apodrecimento de sementes-crestamento de plântula	<i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>B. zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i> , <i>Diplodia maydis</i> , <i>Exserohilum pedicellatum</i> , <i>Exserohilum turcicum</i> = <i>Helminthosporium turcicum</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Gibberella zeae</i> (anamorfo: <i>F. graminearum</i>), <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. zeae</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Mancha foliar de Selenophoma	<i>Selenophoma</i> sp.
Crestamento foliar amarelo	<i>Ascochyta ischaemi</i> , <i>Phyllosticta maydis</i> (teleomorfo: <i>Mycosphaerella zeae-maydis</i>)
Mancha foliar de Zonate	<i>Gloeocercospora sorghi</i>

[00145] Os seguintes são especialmente preferenciais:

- *Plasmodiophoromycota* como *Plasmodiophora brassicae* (hérnia das crucíferas), *Spongospora subterranea*, *Polymyxa graminis*,

- Oomycota como *Bremia lactucae* (míldio de alface), *Peronospora* (míldio) em boca-de-dragão (*P. antirrhini*), cebola (*P. destructor*), espinafre (*P. effusa*), soja (*P. manchurica*), tabaco (“mofo azul”; *P. tabacina*) alfalfa e vetches (*P. trifolium*), *Pseudoperonospora humuli* (míldio pulverulento de lúpulo), *Plasmopara* (míldio de videiras) (*P. viticola*) e girassol (*P. halstedii*), *Sclerophthora macrospora* (míldio em cereais e gramíneas), *Pythium* (por exemplo, tombamento de beterraba Beta causado por *P. debaryanum*), *Phytophthora infestans* (requeima em batata, tomate e similares), *Albugo spec.*

- Ascomycota como *Microdochium nivale* (mofo branco de centeio e trigo), *Fusarium*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (esterilidade parcial da espiga principalmente no trigo), *Fusarium oxysporum* (*Fusarium wilt* de tomate), *Blumeria graminis* (oídio de cevada (f.sp. *hordei*) e trigo (f.sp. *tritici*)), *Erysiphe pisi* (oídio de ervilha), *Nectria galligena* (ferida de *Nectria* de árvores frutíferas), *Uncinula necator* (oídio de videiras), *Pseudopeziza tracheiphila* (doença do fogo vermelho de videira), *Claviceps purpurea* (esporão, por exemplo, trigo e gramíneas), *Gaeumannomyces graminis* (*take-all* no trigo, centeio e outras gramíneas), *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora graminea* (faixa na folha de cevada), *Pyrenophora teres* (mancha-reticular da cevada), *Pyrenophora tritici-repentis* (crestamento foliar de trigo), *Venturia inaequalis* (sarna-da-macieira), *Sclerotinia sclerotium* (quebra de talo, podridão do caule), *Pseudopeziza medicaginis* (manchas das folhas de alfalfa, vetches branco e vermelho).

- Basidiomycetes como *Typhula incarnata* (crestamento de *Typhula blight* em cevada, centeio, trigo), *Ustilago maydis* (pústula no milho), *Ustilago nuda* (ferrugem solta na cevada), *Ustilago tritici* (ferrugem solta no trigo, espelta), *Ustilago avenae* (ferrugem solta em aveia), *Rhizoctonia solani* (apodrecimento radicular de batata), *Sphacelotheca* spp. (carvão do pendão “head smut”) do sorgo), *Melampsora lini* (ferrugem do linho), *Puccinia graminis*

(ferrugem do caule de trigo, cevada, centeio, aveia), *Puccinia recondita* (ferrugem da folha do trigo), *Puccinia dispersa* (ferrugem marrom do centeio), *Puccinia hordei* (ferrugem da folha da cevada), *Puccinia coronata* (ferrugem da coroa de aveia), *Puccinia striiformis* (ferrugem amarela do trigo, cevada, centeio e de um grande número de gramíneas), *Uromyces appendiculatus* (ferrugem marrom do feijão), *Sclerotium rolfsii* (podridão de raiz e caule de muitas plantas).

- *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) como *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* (glume mancha) do trigo (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (eyespot de trigo, cevada, centeio), *Rynchosporium secalis* (manchas das folhas em centeio e cevada), *Alternaria solani* (crestamento precoce de batata, tomate), *Phoma betae* (blackleg em beterraba Beta), *Cercospora beticola* (pontos na folha em beterrana Beta), *Alternaria brassicae* (pontos pretos em colza, couve e outras crucíferas), *Verticillium dahliae* (verticillium wilt), *Colletotrichum*, *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose do feijão), *Phoma lingam* (canela-preta de repolho e colza), *Botrytis cinerea* (mofo cinzento de videira, morango, tomate, lúpulo e similares).

[00146] Especialmente preferencial são os patógenos biotróficos, mais preferencialmente patógenos heminecrotroficos, por exemplo, *Phakopsora pachyrhizi* e/ou esses patógenos que têm essencialmente um mecanismo similar de infecção como *Phakopsora pachyrhizi*, conforme descrito no presente pedido. Particularmente preferencial são os patógenos da subclasse *Pucciniomycetes*, preferencialmente da ordem *Pucciniales* (ferrugem), anteriormente conhecida como *Uredinales*, entre as quais em particular a *Melompsoraceae*. São preferenciais *Phakopsoraceae*, mais preferencialmente *Phakopsora*. Especialmente preferenciais são *Phakopsora pachyrhizi* e/ou *Phakopsora meibomiaae*.

[00147] Além disso, os fungos da ferrugem preferenciais são selecionados a partir do grupo de *Puccinia*, *Gymnosporangium*, *Juniperus*, *Cronartium*, *Hemileia* e *Uromyces*; preferencialmente *Puccinia sorghi*, *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, *Juniperus virginiana*, *Cronartium ribicola*, *Hemileia vastatrix*, *Puccinia graminis*, *Puccinia coronata*, *Uromyces phaseoli*, *Puccinia hemerocallidis*, *Puccinia persistens subsp. Triticina*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis* causas, e/ou *Uromyces appendiculatus*.

[00148] Além disso, patógenos adicionais preferenciais, preferencialmente patógenos de milho, são patógenos que causam doenças de podridão no talo, em particular podridão no talo por *Fusarium*, podridão no talo por *Gibberella*, podridão no talo por *Diplodia* e podridão no talo por Charcoal, e patógenos que causam antracnose. Patógenos preferenciais que causam podridão no talo por *Fusarium* são *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* ou *Fusarium subglutinans*. Patógenos preferenciais que causam podridão no talo por *Gibberella* é *Fusarium graminearum*. Patógenos preferenciais que causam podridão no talo por *Diplodia* é *Diplodia maydis*. Um patógeno preferencial que causa podridão por Charcoal é *Macrophomina phaseolina*. Um patógeno preferencial que causa antracnose é *Colletotrichum graminicola*.

CONSTRUCTOS DE EXPRESSÃO DE MYBTF E CONSTRUCTOS DE VETOR

[00149] CONSTRUÇÃO de vetor recombinante que compreende:

(a) (i) um ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parólogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ligado de maneira funcional a

(b) um promotor e

(c) uma sequência de terminação da transcrição é uma realização adicional da invenção.

[00150] Além disso, é fornecido uma construção do vetor recombinante que compreende:

(a) (i) um ácido nucleico que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ

ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ligado de maneira funcional a

(b) um promotor e

(c) uma sequência de terminação da transcrição é uma realização adicional da invenção.

[00151] Além disso, é fornecido uma construção do vetor recombinante que compreende:

(a) (i) um ácido nucleico que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de

identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ligado de maneira funcional a

(b) um promotor e

(c) uma sequência de terminação da transcrição é uma realização adicional da invenção.

[00152] Além disso, é fornecido uma construção do vetor recombinante que compreende:

(a) (i) um ácido nucleico que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 ou 6;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ligado de maneira funcional a

(b) um promotor e

(c) uma sequência de terminação da transcrição é uma realização adicional da invenção.

[00153] Além disso, é fornecido uma construção do vetor recombinante que compreende:

(a) (i) um ácido nucleico que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3 ou 4;

(ii) um ácido nucleico que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos

99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ligado de maneira funcional a

(b) um promotor e

(c) uma sequência de terminação da transcrição é uma realização adicional da invenção.

[00154] No caso de uma biblioteca genômica, o ambiente genético natural da sequência de ácido nucleico é preferencialmente mantido, pelo menos em parte. O ambiente flanqueia preferencialmente a sequência de ácido nucleico pelo menos em um lado e tem um comprimento de sequência de pelo menos 50 bp, preferencialmente pelo menos 500 bp, especialmente preferencialmente pelo menos 1000 bp, com a máxima preferência pelo menos 5000 bp.

[00155] Os promotores de acordo com a presente invenção podem ser constitutivos, induzíveis, em particular patógeno-induzível, desenvolvimento de estágio-preferencial, célula tipo-preferencial, tecido-

preferencial ou órgão-preferencial. Os promotores constitutivos são ativos sob a maioria das condições. Exemplos não limitantes de promotores constitutivos incluem os promotores de CaMV 19S e 35S (Odell *et al.*, 1985, *Nature* 313:810-812), o promotor de sX CaMV 35S (Kay *et al.*, 1987, *Science* 236:1299-1302), o promotor Sep1, o promotor da actina do arroz (McElroy *et al.*, 1990, *Plant Cell* 2:163-171), o promotor da actina de *Arabidopsis*, o promotor da ubiquitina (Christensen *et al.*, 1989, *Plant Molec. Biol.* 18:675-689); pEmu (Last *et al.*, 1991, *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588), o promotor 35S do vírus do mosaico da escrofulária, o promotor Smas (Velten *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3:2723-2730), o promotor GRP1-8, o promotor de álcool cinamílico desidrogenase (patente US 5.683.439), promotores do T-DNA de *Agrobacterium*, como manopina sintase, nopalina sintase e octopina sintase, a pequena subunidade do promotor de ribulose bifosfato carboxilase (ssuRUBISCO) e/ou similares.

[00156] Preferencialmente, o vetor de expressão da invenção compreende um promotor constitutivo, promotor mesófilo-específico, promotor epiderme-específico, promotor raiz-específico, um promotor induzível de patógeno ou um promotor induzível fúngico.

[00157] Um promotor é induzível, se sua atividade, medida na quantidade de RNA produzido sob controle do promotor, é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% preferencialmente pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300% mais alto em seu estado induzido, que em seu estado não induzido. Um promotor é célula-, tecido- ou órgão-específico, se sua atividade, medida na quantidade de RNA produzido sob controle do promotor, é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% preferencialmente pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 100%, pelo menos

200%, pelo menos 300% mais alto em um tipo de célula, tecido ou órgão específico, então em outros tipos de células ou tecidos da mesma planta, preferencialmente os outros tipos de células ou tecidos são tipos de células ou tecidos do mesmo órgão da planta, por exemplo, uma raiz. No caso de promotores órgão específicos, a atividade de promotor tem que ser comparada à atividade de promotor em outros órgãos da planta, por exemplo, folhas, caules, flores ou sementes. Preferencialmente, o promotor é um promotor constitutivo, promotor mesófilo-específico ou promotor epiderme-específico.

[00158] Em realizações preferenciais, o aumento na quantidade e/ou atividade de proteína da proteína MybTF ocorre de uma maneira constitutiva ou tecido-específica. Em realizações especialmente preferenciais, um aumento essencialmente induzido por patógeno na quantidade e/ou atividade de proteína ocorre, por exemplo, por expressão recombinante do ácido nucleico de MybTF sob o controle de um promotor fúngico-induzível. Em particular, a expressão do ácido nucleico de MybTF ocorre em locais infectados por fungos, onde, no entanto, preferencialmente a expressão do ácido nucleico de MybTF permanece essencialmente inalterado em tecidos não infectados por fungos.

[00159] Promotores preferenciais de estágio de desenvolvimento são preferencialmente expressos em certos estágios de desenvolvimento. Os promotores tecido e órgão preferenciais incluem os que são preferencialmente expressos em certos tecidos ou órgãos, como folhas, raízes, sementes ou xilema. Exemplos de promotores tecido-preferenciais e órgão-preferenciais incluem, mas não se limitam a, promotores fruta-preferenciais, óvulo-preferenciais, tecido masculino-preferenciais, semente-preferenciais, integumento-preferenciais, tubérculo-preferenciais, talo-preferenciais, pericarpo-preferenciais, folha-preferenciais, estigma-preferenciais, pólen-preferenciais, antera-preferenciais, pétala-preferenciais, sépala-preferenciais,

pedicelo-preferenciais, sÍliqua-preferenciais, caule-preferenciais, raiz-preferenciais e/ou similares. Promotores preferenciais de sementes são preferencialmente expressos durante o desenvolvimento da semente e/ou germinação. Por exemplo, promotores de sementes preferenciais podem ser embrião-preferencial, endosperma preferencial e tegumento-preferencial. Consulte Thompson *et al.*, 1989, *BioEssays* 10:108. Exemplos de promotores preferenciais de sementes incluem, mas não se limitam a celulose sintase (celA), Cim1, gama-zeína, globulina-1, zeína 19 kD de milho (cZ19B1) e/ou similares.

[00160] Outros tecidos preferenciais adequados ou promotores Órgão-preferenciais incluem, mas não se limitam ao promotor do gene napin de colza (patente US 5.608.152), o promotor USP de *Vicia faba* (Baeumlein *et al.*, 1991, *Mol Gen Genet.* 225(3):459-67), o promotor de oleosina de *Arabidopsis* (pedido PCT documento WO 98/45461), o promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (patente US 5.504.200), o promotor de Bce4 de *Brassica* (pedido PCT documento WO 91/13980), ou o promotor de B4 de legumina (LeB4; Baeumlein *et al.*, 1992, *Plant Journal*, 2(2):233-9), bem como promotores que conferem expressão específica de semente em plantas monocotiledÔneas como milho, cevada, trigo, centeio, arroz, etc. Promotores adequados para serem observados são os promotores de gene lpt2 ou lpt1 de cevadas (pedido PCT documento WO 95/15389 e pedido PCT documento WO 95/23230) ou os descritos no pedido PCT documento WO 99/16890 (promotores do gene de hordeína de cevada, gene de glutelina de arroz, gene de orizina de arroz, gene de prolamina de arroz, gene de gliadina de trigo, gene de glutelina de trigo, gene de glutelina de aveia, gene de kasirina de sorgo e/ou gene de secalina de centeio).

[00161] Promotores Úteis de acordo com a invenção incluem, mas não se limitam a, serem o principal promotor de proteína de ligação de a/b de

clorofila, promotores de histona, o promotor de Ap3, o promotor de β -conglucina, o promotor de napina, o promotor de lecitina de soja, o promotor de zeína 15kD de milho, o promotor de zeína 22kD, o promotor de zeína 27kD, o promotor de g-zeína, o ceroso, contraído 1, contraído 2, promotores de bronze, o promotor de Zm13 (patente US 5.086.169), os promotores de poligalacturonase de milho (PG) (patentes US 5.412.085 e 5.545.546), o promotor SGB6 (patente US 5.470.359), bem como outros promotores sintéticos ou naturais.

[00162] Promotores epiderme-específicos podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em:

[00163] WIR5 (=GstA1); acc. X56012; Dudler & Schweizer,

[00164] GLP4, acc. AJ310534; Wei Y., Zhang Z., Andersen C.H., Schmelzer E., Gregersen P.L., Collinge D.B., Smedegaard-Petersen V. e Thordal-Christensen H., *Plant Molecular Biology* 36, 101 (1998),

[00165] GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer P., Christoffel A. e Dudler R., *Plant J.* 20, 541 (1999);

[00166] Prx7, acc. AJ003141, Kristensen B.K., Ammitzböll H., Rasmussen S.K. e Nielsen K.A., *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 311 (2001);

[00167] GerA, acc. AF250933; Wu S., Druka A., Horvath H., Kleinhofs A., Kannangara G. e von Wettstein D., *Plant Phys Biochem* 38, 685 (2000);

[00168] OsROC1, acc. AP004656

[00169] RTBV, acc. AAV62708, AAV62707; Klöti A., Henrich C., Bieri S., He X., Chen G., Burkhardt P.K., Wünn J., Lucca P., Hohn T., Potrykus I. e Fütterer J., *PMB* 40, 249 (1999);

[00170] Chitinase ChtC2-Promoter from potato (Ancillo *et al.*, *Planta*. 217(4), 566, (2003));

[00171] Promotor AtProT3 (Grallath *et al.*, *Plant Physiology*.

137(1), 117 (2005));

[00172] SHN-Promoters from Arabidopsis (AP2/EREBP transcription factors involved in cutin and wax production) (Aarón *et al.*, *Plant Cell*. 16(9), 2463 (2004)); e/ou

[00173] GSTA1 do trigo (Dudler *et al.*, WP2005306368 e Altpeter *et al.*, *Plant Molecular Biology*. 57(2), 271 (2005)).

[00174] Promotores mesófilo-específicos podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em:

[00175] PPCZm1 (=PEPC); Kausch A.P., Owen T.P., Zachwieja S.J., Flynn A.R. e Sheen J., *Plant Mol. Biol.* 45, 1 (2001);

[00176] OsrbcsS, Kyoizuka *et al.*, *PlaNt Phys* 102, 991 (1993); Kyoizuka J., McElroy D., Hayakawa T., Xie Y., Wu R. e Shimamoto K., *Plant Phys.* 102, 991 (1993);

[00177] OsPPDK, acc. AC099041;

[00178] TaGF-2.8, acc. M63223; Schweizer P., Christoffel A. e Dudler R., *Plant J.* 20, 541 (1999);

[00179] TaFBPase, acc. X53957;

[00180] TaWIS1, acc. AF467542; patente US 200220115849;

[00181] HvBIS1, acc. AF467539; patente US 200220115849;

[00182] ZmMIS1, acc. AF467514; patente US 200220115849;

[00183] HvPR1a, acc. X74939; Bryngelsson *et al.*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 7 (2), 267 (1994);

[00184] HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson *et al.*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 7(2), 267 (1994);

[00185] HvB1,3gluc; acc. AF479647;

[00186] HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen *et al.*, *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 311 (2001); e/ou

[00187] HvPAL, acc. X97313; Wei Y., Zhang Z., Andersen C.H.,

Schmelzer E., Gregersen P.L., Collinge D.B., Smedegaard-Petersen V. e Thordal-Christensen H. *Plant Molecular Biology* 36, 101 (1998).

[00188] Promotores constitutivos podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em:

- promotor PcUbi de salsa (documento WO 03/102198)
- promotor CaMV 35S: promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Benfey *et al.* 1989 *EMBO J.* 8(8): 2195-2202),
- promotor STPT: promotor translocador triose-fosfato curto de *Arabidopsis thaliana* (Acesso NM_123979)
- promotor Act1: promotor do gene actina 1 de *Oryza sativa* (McElroy *et al.* 1990 *PLANT CELL* 2(2) 163-171 a) e/ou
- promotor EF1A2: Fator EF1 alfa de alongamento de tradução de *Glycine max* (patente US 20090133159).

[00189] Em realizações preferenciais, o aumento na quantidade ou função de proteína da proteína MybTF ocorre de uma maneira constitutiva ou tecido-específica. Em realizações especialmente preferenciais, um aumento essencialmente induzido por patógeno na quantidade de proteína ou função de proteína ocorre, por exemplo, por expressão exógena do ácido nucleico de MybTF sob o controle de um promotor fúngico-induzível, preferencialmente um promotor de ferrugem-induzível. Em particular, a expressão do ácido nucleico de MybTF ocorre em locais infectados por fungos, onde, no entanto, preferencialmente a expressão da sequência de ácido nucleico de MybTF permanece essencialmente inalterada em tecidos não infectados por fungos.

[00190] Preferencialmente, o ácido nucleico MybTF está sob o controle de um promotor mesófilo-específico induzido por ferrugem. Mais preferencialmente, o promotor é o promotor 820 mesófilo-específico induzido por ferrugem.

[00191] Um terminador preferencial é o terminador do gene

inibidor de catepsina D de *Solanum tuberosum*.

[00192] Combinações promotor-terminador preferenciais com o gene de interesse entre esses são um promotor de salsa, preferencialmente, o promotor ubiquitina de salsa, em combinação com o terminador do gene inibidor da catepsina D de *Solanum tuberosum*. Outra combinação promotor-terminador preferencial é o promotor 820 mesofilo-específico induzido por ferrugem em combinação com o terminador do gene inibidor da catepsina D de *Solanum tuberosum*.

[00193] Uma sequência de íntron pode ser adicionada à região 5' não traduzida (UTR) e/ou à sequência codificadora da sequência codificadora parcial para aumentar a quantidade de mensagem madura que se acumula no citosol. Mostrou-se que a inclusão de um íntron de *splice* na unidade de transcrição tanto nos constructos para expressão de vegetais como animais aumentam a expressão gênica em ambos os níveis de mRNA e proteínas em até 1000 vezes (Buchman e Berg (1988) *Mol. Cell Biol.* 8: 4395-4405; Callis *et al.* (1987) *Genes Dev* 1:1183-1200). Esse aumento de íntron da expressão gênica é tipicamente maior quando colocado perto da extremidade 5' da unidade de transcrição. O uso de íntrons do milho Adh1-S íntron 1, 2 e 6, e do íntron Bronze-1 são conhecidos na técnica. Para informações gerais consulte: *The Maize Handbook*, Capítulo 116, Freeling e Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994).

[00194] Um tipo de construção de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a uma alça de DNA de fita dupla circular na qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Certos constructos de vetor são capazes de replicação autônoma em uma célula vegetal hospedeira em que eles são introduzidos. Outros constructos de vetores são integrados no genoma de uma célula vegetal hospedeira mediante

introdução em uma célula hospedeira, e assim são replicados junto com o genoma hospedeiro. Em particular a construção de vetor é capaz de direcionar a expressão de gene para o qual os vetores são ligados de maneira funcional. No entanto, a invenção tem a intenção de incluir essas outras formas de constructos de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, vírus da batata X vírus do chocalho do tabaco e/ou Geminivírus), que atende funções equivalentes.

ORGANISMOS TRANSGÊNICOS; PLANTAS, PARTES DE PLANTAS E CÉLULAS VEGETAIS
TRANSGÊNICAS

[00195] Uma realização preferencial é uma planta transgênica, parte de planta transgênica ou célula vegetal transgênica que superexpressa uma proteína MybTF exógena, preferencialmente a planta transgênica compreende uma construção de expressão recombinante que codifica a proteína MybTF. Preferencialmente, a proteína MybTF superexpressa na planta, parte da planta ou célula vegetal é codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo; ou por

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob

condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00196] Com a máxima preferência, o ácido nucleico exógeno tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9-24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55; ou compreende um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56.

[00197] Uma realização preferencial é uma planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica que superexpressa uma proteína MybTF exógena. Preferencialmente, a proteína MybTF superexpressada na planta, parte da planta ou célula vegetal é codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 1, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo; ou por

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que

tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7 ou 5, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00198] Uma realização preferencial é uma planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica que superexpressa uma proteína MybTF exógena. Preferencialmente, a proteína MybTF superexpressada na planta, parte da planta ou célula vegetal é codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2 ou 6, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo; ou por

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00199] Uma realização preferencial é uma planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica que superexpressa uma proteína MybTF exógena. Preferencialmente, a proteína MybTF superexpressada na planta, parte da planta ou célula vegetal é codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 3 ou 4, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo; ou por

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 5, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos

nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00200] Com a máxima preferência, o ácido nucleico exógeno tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1; ou compreende um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7 ou 5.

[00201] Com a máxima preferência, o ácido nucleico exógeno tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1 ou 6; ou compreende um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7.

[00202] Com a máxima preferência, o ácido nucleico exógeno tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3 ou 4; ou compreende um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 5.

[00203] Em realizações preferenciais, a quantidade de proteína de uma proteína MybTF na planta transgênica é aumentada por pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou mais em comparação a uma planta tipo selvagem que não é transformada com o ácido nucleico de MybTF.

[00204] Mais preferencialmente, a planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica de acordo com a presente invenção foi obtida por transformação com um vetor recombinante descrito no presente pedido.

[00205] Métodos adequados para transformação ou transfecção de células hospedeiras incluindo células vegetais são conhecidos na técnica de biotecnologia vegetal. Qualquer método pode ser usado para transformar o vetor de expressão recombinante nas células vegetais para produzir as plantas transgênicas da invenção. Métodos gerais para transformar plantas dicotiledôneas são divulgados, por exemplo, nas patentes US 4.940.838; 5.464.763 e similares. Métodos para transformar plantas dicotiledôneas específicas, por exemplo, algodão, são apresentados nas patentes US 5.004.863, 5.159.135 e 5.846.797. Os métodos de transformação da soja são apresentados nas patentes US 4.992.375, 5.416.011, 5.569.834, 5.824.877, 6.384.301 e na patente EP 0301749B1 podem ser usados. Os métodos de transformação podem incluir métodos diretos e indiretos de transformação. Métodos diretos adequados incluem absorção de DNA induzida por polietilenoglicol, transformação mediada por lipossomo (patente US 4.536.475), métodos biolísticos com o uso de arma genética (Fromm ME *et al.*, Bio/Technology. 8(9):833-9, 1990; Gordon-Kamm *et al.* *Plant Cell* 2:603, 1990), eletroporação, incubação de embriões secos em solução que compreende DNA e microinjeção. No caso desses métodos de transformação direta, os

plasmídeos usados não necessitam satisfazer nenhum requisito específico. Plasmídeos simples, como esses da série pUC, pBR322, série M13mp, pACYC184 e similares podem ser usados. Se plantas intactas são para ser regeneradas a partir das células transformadas, um gene marcador selecionável adicional está preferencialmente localizado no plasmídeo. As técnicas de transformação direta são igualmente adequadas para plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas.

[00206] A transformação também pode ser realizada por infecção bacteriana por meio de *Agrobacterium* (por exemplo, patente EP 0.116.718), infecção viral por meio de vetores virais (patente EP 0.067.553, patente US 4.407.956, documento WO 95/34668, documento WO 93/03161) ou por meio de pólen (patente EP 0.270.356, documento WO 85/01856, patente US 4.684.611). As técnicas de transformação baseadas em *Agrobacterium* (especialmente para plantas dicotiledôneas) são bem conhecidas na técnica. A linhagem de *Agrobacterium* (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*) compreende um plasmídeo (plasmídeo Ti ou Ri) e um elemento de T-DNA que é transferido para a planta após infecção com *Agrobacterium*. O T-DNA (DNA transferido) é integrado no genoma da célula vegetal. O T-DNA pode estar localizado no plasmídeo Ri ou Ti ou está separadamente compreendido em um, assim chamado, vetor binário. Métodos para a transformação mediada por *Agrobacterium* são descritos, por exemplo, em Horsch RB *et al.* (1985) *Science* 225:1229. A transformação mediada por *Agrobacterium* é mais adequada para plantas dicotiledôneas, mas também foi adaptada para plantas monocotiledôneas. A transformação de plantas por *Agrobacteria* é descrita, por exemplo, em White FF, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, editado por S.D. Kung e R. Wu, Academic Press, 1993, páginas 15 - 38; Jenes B *et al.* *Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and*

Utilization, editado por S.D. Kung e R. Wu, *Academic Press*, 1993, páginas 128-143; Potrykus (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 42:205- 225. A transformação pode resultar em transformação temporária ou e expressão estável. Embora uma sequência de nucleotídeo da presente invenção possa ser inserida em qualquer planta e célula vegetal incluídas nessas classes amplas, é particularmente útil em células vegetais de cultura.

[00207] As células vegetais modificadas geneticamente podem ser regeneradas através de todos os métodos com os quais um técnico no assunto está familiarizado. Métodos adequados podem ser encontrados nas publicações acima mencionadas por S.D. Kung e R. Wu, Potrykus ou Höfgen e Willmitzer.

[00208] Após a transformação, as células ou agrupamentos de células vegetais podem ser selecionados para a presença de um ou mais marcadores que são codificados pelos genes expressíveis na planta cotransfectada com o gene de interesse, após o qual o material transformado é regenerado em uma planta inteira. Para selecionar as plantas transformadas, o material vegetal obtido na transformação é, em regra, submetido a condições seletivas de modo que as plantas transformadas podem ser distinguidas das plantas não transformadas. Por exemplo, as sementes obtidas da maneira acima descrita podem ser plantadas e, após período de crescimento inicial, submetidas a uma seleção adequada por aspersão. Uma possibilidade adicional consiste no cultivo das sementes, se apropriado após esterilização, em placas de ágar com o uso de um agente de seleção adequado, de modo que somente as sementes transformadas podem crescer como plantas. De maneira alternativa, as plantas transformadas são triadas para a presença de um marcador selecionável como os descritos acima. As plantas transformadas também podem ser diretamente selecionadas por triagem quanto à presença do ácido nucleico de MybTF.

[00209] Após transferência de DNA e regeneração, plantas supostamente transformadas também podem ser avaliadas, por exemplo, com o uso de análise Southern quanto à presença do gene de interesse, número de cópias e/ou organização genômica. De maneira alternativa ou adicionalmente, os níveis de expressão do DNA recém-introduzido podem ser monitorados com o uso de análise de Northern e/ou Western, ambas as técnicas sendo bem conhecidas por técnicos no assunto.

[00210] As plantas transformadas regeneradas podem ser propagadas por uma variedade de formas, como as técnicas de propagação clonal ou de reprodução clássica. Por exemplo, uma planta transformada de primeira geração (ou T1) pode ser autofecundada e os transformantes homozigóticos de segunda geração (ou T2) selecionados, e as plantas T2 podem então ser ainda propagadas através de técnicas clássicas de reprodução. Os organismos transformados gerados podem apresentar uma variedade de formas. Por exemplo, eles podem ser quimeras de células transformadas e células não transformadas; transformantes clonais (por exemplo, todas as células transformadas para conter o cassete de expressão); enxertos de tecidos transformados e não transformados (por exemplo, em plantas, um porta-enxerto transformado enxertado em um rebento não transformado).

[00211] Preferencialmente, constructos, vetores ou cassetes de expressão não estão presentes no genoma da planta original ou estão presentes no genoma da planta transgênica sem seu *locus* natural do genoma da planta original.

[00212] Preferencialmente, a planta transgênica da presente invenção ou a planta obtida pelo método da presente invenção tem resistência aumentada contra patógenos fúngicos, preferencialmente patógenos da ferrugem (isto é, patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales), preferencialmente

contra patógenos fúngicos da Família Phacopsoraceae, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phacopsora*, mais preferencialmente contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecidos como ferrugem da soja. Preferencialmente, a resistência contra *Phakopsora pachyrhizi* e/ou *Phakopsora meibomiae* é aumentada.

[00213] Preferencialmente, a planta, parte da planta ou célula vegetal é uma planta ou derivada de uma planta selecionada a partir do grupo que consiste em feijões, soja, ervilha, *clover*, *kudzu*, luzerna, lentilhas, tremoço, *vetches*, amendoim, arroz, trigo, cevada, *arabidopsis*, lentilha, banana, canola, algodão, batata, milho, cana-de-açúcar, alfafa e beterraba.

[00214] Em uma realização da presente invenção a planta é selecionada a partir do grupo que consiste em feijões, soja, ervilha, *vetches*, *kudzu*, luzerna, lentilhas, tremoços, ervilhacas e/ou amendoim. Preferencialmente, a planta é um legume, que compreende plantas do Gênero *Phaseolus* (que compreende feijão francês, feijão anão, feijão de corda (*Phaseolus vulgaris*), feijão de Lima (*Phaseolus lunatus* L.), feijão Tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray), feijão runner (*Phaseolus coccineus*)); o Gênero *Glycine* (que compreende *Glycine soja*, sojas (*Glycine max* (L.) Merrill)); ervilha (*Pisum*) (que compreende ervilhas em vagem (“shelling”) (*Pisum sativum* L. convar. *sativum*), também chamada de ervilhas lisas ou de sementes redondas; ervilha marrowfat (*Pisum sativum* L. convar. *medullare* Alef. emend. C.O. Lehm), ervilha açúcar (*Pisum sativum* L. convar. *axiphium* Alef emend. C.O. Lehm), também chamada de ervilha torta (“snow pea”, ervilha comestível ou mangetout, (*Pisum granda sneida* L. convar. *sneidulo* p. *shneiderium*)); amendoim (*Arachis hypogaea*), *vetches* (*Trifolium spec.*), medick (*Medicago*), videira kudzu (*Pueraria lobata*), luzerna comum, alfalfa (*M. sativa* L.), grão-de-bico (Cicer), lentilha (Lens) (*Lens culinaris* Medik.), tremoço (*Lupinus*); ervilhacas (*Vicia*), favarola, fava (*Vicia faba*), vetchling (*Lathyrus*) (que

compreende ervilha chickling (*Lathyrus sativus*), ervilha do mato (*Lathyrus tuberosus*)); Gênero *Vigna* (que compreende feijão moth (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Maréchal), feijão azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi), feijão urd (*Vigna mungo* (L.) Hepper), feijão mung (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), amendoim bambara (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), feijão arroz (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi), *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., *Vigna unguiculata* (L.) Walp., nas três subespécies feijão aspargo, feijão fradinho, feijão de vaca)); guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.), o gênero *Macrotyloma* (que compreende amendoim geocarpa (*Macrotyloma geocarpum* (Harms) Maréchal & Baudet), feijão cavalo (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.); feijão goa (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.), feijão inhame africano (*Sphenostylis stenocarpa* (Hochst. ex A. Rich.) Harms), feijão preto egípcio, feijão dolichos, feijão lablab (*Lablab purpureus* (L.) Sweet), feijão inhame (*Pachyrhizus*), feijão guar (*Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub.); e/ou o gênero *Canavalia* (que compreende feijão de porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.), feijão espada (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.).

[00215] Ainda preferencial é uma planta selecionada a partir do grupo que consiste em feijões, soja, ervilha, *vetches*, *kudzu*, luzerna, lentilhas, tremoços, ervilhaca e amendoim. Com a máxima preferência, a planta, parte da planta ou célula vegetal é derivada de soja.

[00216] Preferencialmente, a planta transgênica da presente invenção ou a planta obtida pelo método da presente invenção é uma planta de soja e tem resistência aumentada contra patógenos fúngicos da Ordem Pucciniales (ferrugem), preferencialmente, da Família Phacopsoraceae, mais preferencialmente contra patógenos fúngicos do Gênero *Phakopsora*, com a máxima preferência contra *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomiae*, também conhecido como ferrugem da soja. Preferencialmente, a resistência contra *Phakopsora pachyrhizi* e/ou *Phakopsora meibomiae* é aumentada.

MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

[00217] Uma realização de acordo com a presente invenção fornece um método para produzir uma planta transgênica, uma parte de planta transgênica ou uma célula vegetal transgênica resistente a um patógeno fúngico, preferencialmente da Família Phacosporaceae, por exemplo, ferrugem da soja, em que o ácido nucleico recombinante usado para gerar uma planta transgênica compreende um promotor que é funcional na célula vegetal, ligado de maneira funcional a um ácido nucleico de MybTF, que é preferencialmente SEQ ID NO: 2, 3, 6, 4 ou 1, e

- uma sequência reguladora terminadora.

[00218] Em uma realização, a presente invenção refere-se a um método para a produção de uma planta transgênica, parte de planta transgênica ou célula vegetal transgênica que tem resistência aos fungos aumentada, que compreende:

(a) introduzir uma construção de vetor recombinante de acordo com a presente invenção em uma planta, uma parte da planta ou uma célula vegetal, e

(b) gerar uma planta transgênica a partir da planta, parte da planta ou célula vegetal.

Preferencialmente, o método para a produção da planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica compreende ainda as etapas de:

(c) expressar a proteína MybTF, preferencialmente codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00219] Preferencialmente, a dita introdução e expressão não compreende um processo essencialmente biológico.

[00220] Mais preferencialmente, o método para a produção da planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica compreende ainda as etapas de:

(c) expressar a proteína MybTF, preferencialmente codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 1, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que

tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7 ou 5, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00221] Mais preferencialmente, o método para a produção da planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica compreende ainda as etapas de:

(c) expressar a proteína MybTF, preferencialmente codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2 ou 6, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por;

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00222] Mais preferencialmente, o método para a produção da planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica compreende ainda as etapas de:

(c) expressar a proteína MybTF, preferencialmente codificada por:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 3 ou 4, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 5, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos aumentada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos

nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00223] Preferencialmente, o método para a produção da planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal transgênica compreende ainda a etapas de selecionar uma planta transgênica que expressa:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional do mesmo, ou um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade de sequência, ou até 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos

ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica o mesmo polipeptídeo MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00224] Preferencialmente, o método para a produção da planta transgênica, parte da planta transgênica ou célula vegetal adicionalmente compreende a etapa de colher as sementes da planta transgênica e plantar as sementes e cultivar as sementes até plantas, em que a(s) planta(s) cultivada(s) compreende(m):

(i) o ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) o ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que compreende a sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) o ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos

nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) o ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00225] Preferencialmente a etapa de coletar as sementes da planta transgênica, plantar as sementes e cultivar as sementes até plantas, em que a(s) planta(s) cultivada(s) compreendem:

(i) o ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) o ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que compreende a sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) o ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou

(iv) o ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético;

- é repetida mais de uma vez, preferencialmente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 vezes.

[00226] As plantas transgênicas podem ser selecionadas por métodos conhecidos conforme descrito acima (por exemplo, por seleção quanto à presença de um ou mais marcadores que são codificados por genes cotransferidos que podem ser expressos em plantas com o gene de MybTF ou diretamente por triagem quanto ao ácido nucleico de MybTF).

[00227] Além disso, é fornecido o uso do ácido nucleico exógeno de MybTF ou a construção de vetor recombinante que compreende o ácido nucleico de MybTF para a transformação de uma planta, parte da planta ou célula vegetal para fornecer uma planta resistente a fungos, parte da planta ou célula vegetal.

PARTES COLETÁVEIS E PRODUTOS

[00228] Partes coletáveis da planta transgênica de acordo com a presente invenção são parte da invenção. Preferencialmente, as partes coletáveis compreendem o ácido nucleico de MybTF ou proteína MybTF. As partes coletáveis podem ser sementes, raízes, folhas e/ou flores que compreendem o ácido nucleico de MybTF ou proteína MybTF ou partes dos mesmos. Partes preferenciais de plantas de soja são os feijões da soja que compreendem o ácido nucleico de MybTF ou proteína MybTF.

[00229] Os produtos derivados de uma planta transgênica de acordo com a presente invenção, partes da mesma ou partes coletáveis da mesma são parte da invenção. Um produto preferencial é refeição ou óleo, preferencialmente, farelo de soja ou óleo de soja. Preferencialmente, a farelo de soja e/ou óleo de soja compreende o ácido nucleico de MybTF ou proteína

MybTF.

[00230] Preferencialmente, as partes coletáveis da planta transgênica de acordo com a presente invenção ou os produtos derivados das mesmas a partir de uma planta transgênica compreendem uma molécula de ácido nucleico exógeno que consiste ou que compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parólogo da mesma, ou uma variante de *splice* da mesma;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína MybTF que compreende uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%,

pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 1, 2, 4 ou 6; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico exógeno que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estringência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ou em que a parte coletável da planta transgênica ou o produto derivado da planta transgênica compreende uma proteína MybTF codificada por qualquer um dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iv).

MÉTODOS PARA FABRICAR UM PRODUTO

[00231] Em uma realização o método para a produção de um produto compreende:

- a) cultivar as plantas da invenção ou que podem ser obtidas pelos métodos da invenção, e
- b) produzir o dito produto a partir de, ou pelas plantas da

invenção e/ou partes, por exemplo, sementes dessas plantas.

[00232] Em uma realização adicional, o método compreende as etapas de a) cultivar as plantas da invenção, b) remover as partes coletáveis, conforme definido acima, a partir das plantas e c) produzir o dito produto a partir de, ou pelas partes coletáveis de acordo com a invenção.

[00233] Preferencialmente, os produtos obtidos pelo dito método compreendem uma molécula de ácido nucleico exógeno que consiste ou compreende um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem, em ordem crescente, de preferência, pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico representada pela SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parólogo da mesma, ou uma variante de *splice* da mesma;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína MybTF que compreende uma sequência de aminoácidos que tem, em ordem crescente, de preferência pelo menos 70%, pelo menos 71%, pelo menos 72%, pelo menos 73%, pelo menos 74%, pelo menos 75%, pelo menos 76%, pelo menos 77%, pelo menos 78%, pelo menos 79%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo

menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional, derivado, ortólogo ou parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína MybTF tem essencialmente a mesma atividade biológica que uma proteína MybTF codificada pela SEQ ID NO: 1, 2, 4 ou 6; preferencialmente a proteína MybTF confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) uma molécula de ácido nucleico exógeno que hibridiza com uma sequência complementar de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de (i) ou (ii) sob condições de hibridização de alta estringência; preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF como os ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético,

- ou em que o produto obtido pelo dito método compreende uma proteína MybTF codificada por qualquer um dos ácidos nucleicos de MybTF de (i) a (iv).

[00234] O produto pode ser produzido no local onde a planta foi cultivada, as plantas e/ou partes das mesmas podem ser removidas do local onde as plantas foram cultivadas para produzir o produto. Tipicamente, a planta

é cultivada, as partes coletáveis desejadas são removidas da planta, se possível, em ciclos repetidos, e o produto produzido a partir das partes coletáveis da planta. A etapa de crescimento da planta pode ser realizada apenas uma vez a cada vez que os métodos da invenção são realizados, embora permitindo repetidas vezes as etapas de produção do produto, por exemplo, por remoção repetida de partes coletáveis das plantas da invenção e, se necessário, posterior processamento dessas partes para se chegar ao produto. Também é possível que a etapa de cultivo das plantas da invenção seja repetida e as plantas ou partes coletáveis sejam armazenadas até que a produção do produto seja então executada uma vez para as plantas ou partes das plantas acumuladas. Também, as etapas de cultivo das plantas e produção do produto podem ser realizadas com uma sobreposição de tempo, mesmo que simultaneamente a uma grande extensão, ou sequencialmente. Geralmente as plantas são cultivadas por algum tempo antes do produto ser produzido.

[00235] Em uma realização, os produtos produzidos pelos métodos da invenção são produtos de plantas como, mas não se limitam a, um gênero alimentício, ração para animais, um suplemento alimentar, suplemento de ração, fibra, cosmético e/ou produto farmacêutico. Gêneros alimentícios são considerados como composições usadas para nutrição e/ou para nutrição suplementar. Rações para animais e suplementos de alimentação animal, em particular, são considerados como gênero alimentício.

[00236] Em outra realização, os métodos inventivos para produção são usados para produzir produtos agrícolas como, mas não se limitando a, extratos vegetais, proteínas, aminoácidos, carboidratos, gorduras, óleos, polímeros, vitaminas e similares.

[00237] É possível que um produto vegetal consista de um ou mais produtos agrícolas em grande parte.

**MÉTODOS PARA MELHORAMENTO/MÉTODOS PARA APRIMORAMENTO DE
PLANTA/MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE VARIEDADE DE PLANTA**

[00238] As plantas transgênicas da invenção podem ser cruzadas com plantas transgênicas similares ou com plantas transgênicas que carecem dos ácidos nucleicos da invenção ou com plantas não transgênicas, com o uso dos métodos de cruzamento de plantas, para preparar sementes. Ainda, as células vegetais ou plantas transgênicas da presente invenção podem compreender e/ou serem cruzadas com outra planta transgênica que compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos, criando assim uma “pilha” de transgenes na planta e/ou na sua progênie. A semente é então plantada para se obter uma planta transgênica fértil cruzada que compreende o ácido nucleico de MybTF. A planta transgênica fértil cruzada pode ter o cassete de expressão específico herdado através de um parental feminino ou através de um parental masculino. A segunda planta pode ser uma planta inata. A transgênica fértil cruzada pode ser um híbrido. Também incluídos na presente invenção estão as sementes de qualquer uma dessas plantas transgênicas férteis cruzadas. As sementes desta invenção podem ser colhidas de plantas transgênicas férteis e serem usadas para cultivar gerações de progênie de plantas transformadas desta invenção, incluindo linhagens de plantas híbridas que compreendem o ácido nucleico exógeno.

[00239] Dessa forma, uma realização da presente invenção é um método para reprodução de uma planta resistente a fungos que compreende as etapas de:

- (a) cruzar uma planta transgênica descrita no presente pedido ou uma planta que pode ser obtida por um método descrito no presente pedido com uma segunda planta;
- (b) obter uma semente ou sementes resultantes da etapa de cruzamento descrita em (a);

(c) plantar a dita semente ou sementes e cultivar a semente ou sementes até plantas; e

(d) selecionar a partir das ditas plantas, as plantas que expressam uma proteína MybTF, preferencialmente codificada por um ácido nucleico que compreende:

(i) um ácido nucleico exógeno que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 3, 1, 6, 4, 8, 9 a 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 ou 55, um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo, ou uma variante de *splice* do mesmo;

(ii) um ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 7, 5, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 ou 56, ou um fragmento funcional do mesmo, um ortólogo ou um parálogo do mesmo; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle;

(iii) um ácido nucleico exógeno capaz de hibridizar sob condições estridentes com uma sequência complementar de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com (i) ou (ii); preferencialmente que codifica uma proteína MybTF; preferencialmente em que os códigos de moléculas de ácidos nucleicos para um polipeptídeo que tem propriedades essencialmente idênticas ao polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 7 ou 5; preferencialmente a proteína codificada confere resistência aos fungos melhorada em relação às plantas de controle; e/ou por

(iv) um ácido nucleico exógeno que codifica a mesma proteína MybTF que os ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima, mas difere dos ácidos nucleicos de (i) a (iii) acima devido à degeneração do código genético.

[00240] Outra realização preferencial é um método para melhorar a planta, que compreende:

(a) obter uma planta transgênica por qualquer um dos métodos da presente invenção;

(b) combinar dentro de uma célula vegetal o material genético de pelo menos uma célula vegetal da planta de (a) com o material genético de pelo menos uma célula que difere em ou mais genes das células de planta das plantas de (a) ou cruzar a planta transgênica de (a) com uma segunda planta;

(c) obter semente de pelo menos uma planta gerada a partir da célula vegetal de (b) ou da planta do cruzamento da etapa (b);

(d) plantar as ditas sementes e cultivar as sementes até plantas; e

(e) selecionar a partir das ditas plantas, plantas que expressam o ácido nucleico que codifica a proteína MybTF; e opcionalmente

(f) produzir material de propagação a partir das plantas que expressam o ácido nucleico que codifica a proteína MybTF.

[00241] As plantas transgênicas podem ser selecionadas por métodos conhecidos conforme descrito acima (por exemplo, por seleção quanto à presença de um ou mais marcadores que são codificados por genes cotransferidos que podem ser expressos em plantas com o gene de MybTF ou triando o próprio ácido nucleico de MybTF).

[00242] De acordo com a invenção presente, o ácido nucleico de MybTF introduzido pode ser mantido estavelmente na célula vegetal se este for incorporado em um replicon autônomo não cromossômico ou integrado nos cromossomos da planta. Se presente em uma construção de vetor extracromossômico não replicante ou replicante ou em uma construção de vetor que é integrado em um cromossomo, o ácido nucleico exógeno de MybTF preferencialmente reside em um cassete de expressão de planta. Um cassete de expressão de planta preferencialmente contém sequências reguladoras capazes de dirigir a expressão gênica em células vegetais que são

funcionalmente ligadas de modo que cada sequência possa cumprir sua função, por exemplo, terminação da transcrição por sinais de poliadenilação. Sinais de poliadenilação preferenciais são aqueles que se originam do t-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* de modo que o gene 3 conhecido octopina sintase do plasmídeo Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3:835) ou equivalentes funcionais do mesmo, mas também todos os outros terminadores funcionalmente ativos em plantas são adequados. Visto que a expressão gênica de planta muitas vezes não está limitada aos níveis de transcrição, um cassete de expressão de planta preferencialmente contém outras sequências funcionais ligadas como *enhancers* de tradução, como a sequência de alta atividade contendo a sequência líder 5' não traduzida do vírus do mosaico do tabaco, aumentando o polipeptídeo por razão de RNA (Gallie *et al.*, 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711). Exemplos de vetores de expressão de planta incluem aqueles detalhados em: Becker, D. *et al.*, 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; Bevan, M.W., 1984, Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucl. Acid. Res.* 12:8711-8721; e Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; em: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung e R. Wu, *Academic Press*, 1993, S. 15-38.

EXEMPLOS

[00243] Os seguintes exemplos não se destinam a limitar o escopo das reivindicações da invenção, mas são de preferência destinados a serem exemplares de certas realizações. Quaisquer variações nos métodos exemplificados que ocorram a um técnico no assunto têm a intenção de se enquadrar dentro do escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1

MÉTODOS GERAIS

[00244] A síntese química de oligonucleotídeos pode ser afetada,

por exemplo, de uma forma conhecida com o uso do método da fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª Edição, Wiley Press New York, páginas 896-897). As etapas de clonagem realizadas para os propósitos da presente invenção como, por exemplo, clivagens de restrição, eletroforese em gel de agarose, purificação de fragmentos de DNA, transferência de ácidos nucleicos para membranas de nitrocelulose e de nylon, fragmentos ligantes de DNA, transformação de células *E. coli*, culturas bacterianas, multiplicação de fago e análise de sequências de DNA recombinante, são realizadas conforme descrito por Sambrook *et al.* *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989), ISBN 0-87969-309-6. O sequenciamento de moléculas de DNA recombinante é realizado com o uso de sequenciador de DNA com fluorescência a laser MWG-Licor, seguindo o método de Sanger (Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 (1977)).

EXEMPLO 2

CLONAGEM DE CONSTRUÇÃO DE VETOR DE SUPEREXPRESSÃO

[00245] A sequência de DNA genômico e os cDNAs otimizados dos genes MybTF mencionados nesse pedido foram gerados por síntese de DNA (Geneart, Regensburg, Alemanha).

[00246] ODNA de MybTF((conforme mostrado na SEQ ID NO: 1) foi sintetizado de modo que um sítio de restrição PacI estivesse localizado em frente do ATG de início e um sítio de restrição AscI a jusante do códon de parada. O DNA sintetizado foi digerido com o uso das enzimas de restrição PacI e AscI (NEB Biolabs) e ligado em um vetor Gateway pENTRY-B digerido com PacI/AscI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) de uma forma que o fragmento inteiro estivesse localizado na direção *sense* entre o promotor ubiquitina de salsa e o terminador octopina sintase derivado de *Agrobacterium tumefaciens* (t-OCS). O promotor PcUbi regula a expressão constitutiva do gene ubi4-2 (número de acesso X64345) de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.* 1993 *Plant Molecular Biology* 21(4): 673 - 684).

[00247] Para obter o vetor de transformação de planta binária, uma tripla reação LR (sistema Gateway, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) foi realizada de acordo com protocolo do fabricante pelo uso de um vetor pENTRY-A vazio, do promotor PcUbi::MybTF::OCS-terminador no vetor pENTRY-B descrito acima e um vetor pENTRY-C vazio. Como alvo foi usado um vetor pDEST binário, o qual é composto de: (1) um cassete de resistência a Espectinomicina/Estreptomicina para seleção bacteriana, (2) uma origem pVS1 para replicação em *Agrobacteria*, (3) uma origem ColE1 de replicação para manutenção estável em *E. coli*, e (4) entre o limite esquerdo e direito uma seleção AHAS sob controle de um promotor PcUbi (consulte a Figura 2). A reação de recombinação foi transformada em *E. coli* (DH5alfa), mini-preparada e triada por digestões de restrição específica. Um clone positivo de cada CONSTRUÇÃO de vetor foi sequenciado e submetido a transformação da soja.

EXEMPLO 3

TRANSFORMAÇÃO DE SOJA

[00248] Os constructos de vetores de expressão (consulte Exemplo 2) foram transformados na soja.

3.1 ESTERILIZAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA

[00249] Na prática qualquer semente de qualquer variedade de soja pode ser empregada no método da invenção. Uma variedade de cultivar de soja (incluindo Jack, Williams 82, Jake, Stoddard e Resnik) é apropriada para a transformação de soja. Sementes de soja foram esterilizadas em uma câmara com um gás de cloro produzido pela adição de 3,5 mL de HCl 12N gotejado em 100 mL de alvejante (hipoclorito de sódio 5,25%) em um dessecador com uma tampa hermética. Após 24 a 48 horas na câmara, sementes foram removidas e aproximadamente 18 a 20 sementes foram plaqueadas em meio sólido GM com ou sem 6-benzil-aminopurina 5 µM (BAP)

em placas de Petri de 100 mm. Mudas sem BAP são mais alongados e com raízes mais desenvolvidas, especialmente a formação de raízes secundárias e laterais. BAP fortalece as mudas por formação de mudas mais baixas e atarracadas.

[00250] Mudas com sete dias de vida cultivadas na luz ($>100 \mu\text{Einstein/m}^2\text{s}$) a 25°C foram usadas para material de explante para os três tipos de explantes. Nesse momento, o tegumento foi dividido, e o epicótilo com folhas unifoliadas foi cultivado até, no mínimo, o comprimento dos cotilédones. O epicótilo deve ter pelo menos 0,5 cm para evitar que o tecido do nó cotiledonar (uma vez que cultivares de soja e lotes de sementes podem variar no tempo de desenvolvimento, uma descrição da fase de germinação é mais precisa do que um tempo de germinação específico).

[00251] Para inoculação das mudas completas, consulte o Método A (Exemplos 3.3. e 3.3.2) ou explantes foliares, consulte o Método B (Exemplo 3.3.3).

[00252] Para o Método C (consulte o Exemplo 3.3.4), o hipocótilo e um e meio ou parte de ambos os cotilédones foram removidos de cada muda. As mudas foram então colocadas em meio de propagação por 2 a 4 semanas. As mudas produziram vários brotos ramificados para se obter explantes. A maioria dos explantes originou-se a partir de plântulas cultivadas a partir da gema apical. Esses explantes foram preferencialmente usados como tecido alvo.

3.2 CRESCIMENTO E PREPARAÇÃO DE CULTURA DE *AGROBACTERIUM*

[00253] Culturas de *Agrobacterium* foram preparadas por esfregação de *Agrobacterium* (por exemplo, *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*) carregando o vetor binário desejado (por exemplo, H. Klee. R. Horsch e S. Rogers 1987 *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation and its further Applications to Plant Biology*; *Annual Review of Plant Physiology* Vol. 38: 467-

486) sobre meio sólido de crescimento YEP (meio YEP: 10 g de extrato de levedura, 10 g de Bacto Peptone, 5 g de NaCl, ajustar pH para 7,0, e trazer para volume final de 1 litro com H₂O, para placas de ágar YEP, adicionar 20 g de Ágar, autoclavar) e incubar a 25°C até as colônias aparecerem (cerca de 2 dias). Dependendo dos genes marcadores selecionáveis presentes nos plasmídeos Ti ou Ri, o vetor binário, e os cromossomos bacterianos, compostos diferentes de seleção foram usados para *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* em meio YEP sólido e líquido. Várias linhagens de *Agrobacterium* podem ser usadas para o método de transformação.

[00254] Após aproximadamente dois dias, uma única colônia (com um palito estéril) foi selecionada e 50 mL de líquido YEP foi inoculado com antibióticos e agitados a 175 rpm (25°C.) até uma OD₆₀₀ entre 0,8 a 1,0 ser alcançada (aproximadamente 2 dias). Estoques de glicerol de trabalho (15%) para transformação são preparados em 1 mL de estoque de *Agrobacterium* aliquoteado em tubos Eppendorf de 1,5 mL, em seguida, armazenados a -80°C.

[00255] Um dia antes da inoculação do explante, 200 mL de YEP foram inoculados com 5 µL a 3 mL de estoque de *Agrobacterium* de trabalho em frasco Erlenmeyer de 500 mL. O frasco foi agitado durante a noite a 25°C até que a OD₆₀₀ estivesse entre 0,8 e 1,0. Antes de preparar os explantes de soja, a *Agrobacteria* foi peletizada por centrifugação por 10 minutos a 5.500 x g a 20°C. O pélete foi ressuspensão em CCM líquido até a densidade desejada (OD₆₀₀ 0,5 a 0,8) e colocado à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos antes do uso.

3.3 PREPARAÇÃO DE EXPLANTE E COCULTIVO (INOCULAÇÃO)

3.3.1 MÉTODO A: PREPARAÇÃO DE EXPLANTE NO DIA DE TRANSFORMAÇÃO

[00256] As mudas nesse tempo tinham epicótilo alongado de pelo menos 0,5 cm, mas geralmente entre 0,5 e 2 cm. Epicótilos alongados com até 4 cm de comprimento foram empregados com sucesso. Os explantes foram

então preparados com: i) com ou sem algumas raízes, ii) com um parcial, um ou ambos os cotilédones, todas as folhas pré-formadas foram removidas incluindo o meristema apical, e o nó localizado primeiro conjunto de folhas foi ferido com vários cortes, com o uso de um bisturi afiado.

[00257] Esse corte no nó não induziu apenas infecção com *Agrobacterium*, mas também distribuiu as células do meristema axilar e danificou brotos pré-formados. Após ferimento e preparação, os explantes foram reservados em uma placa de Petri e subsequentemente cocultivados com a mistura CCM líquido/*Agrobacterium* por 30 minutos. Os explantes foram então removidos do meio líquido e plaqueados no topo de um filtro de papel estéril em placas de Petri de 15 x 100 mm com meio sólido de cocultivo. Os tecidos alvos feridos foram colocados de modo que eles ficassem em contato direto com o meio.

3.3.2 MÉTODO A MODIFICADO: PREPARAÇÃO DE EXPLANTE DE EPICÓTILO

[00258] Segmentos de epicótilos de soja preparados a partir de mudas de 4 a 8 dias foram usados como explantes para regeneração e transformação. Sementes de soja cv. L00106CN, 93-41131 e Jack foram germinadas em sais MS 1/10 ou meio de composição similar com ou sem citocininas por 4 a 8 dias. Explantes epicótilos foram preparados removendo o nó cotiledonar e nó do caule a partir da secção do caule. O epicótilo foi cortado em 2 a 5 segmentos. São especialmente preferenciais segmentos ligados ao nó primário ou maior nó compreendendo tecido meristemático axilar.

[00259] Os explantes foram usados para infecção por *Agrobacterium*. *Agrobacterium* AGL1 portando um plasmídeo com o gene de interesse (GOI) e o AHAS, gene marcador selecionável bar ou dsdA foi cultivado em meio LB com antibióticos apropriados durante a noite, colhidos e ressuspensos em meio de inoculação com acetoseringona. Segmentos epicótilos recentemente preparados foram embebidos em suspensão de

Agrobacterium por 30 a 60 minutos e então os explantes foram secos com papel absorvente em papéis filtro estéril. O explantes inoculados foram então cultivados em meio de cocultura com L-cisteína e TTD e outros químicos como acetoseringona para aumentar a oferta de T-DNA por 2 a 4 dias. Os explantes de epicótilos infectados foram então colocados em um meio de indução de broto com agente de seleção como imazapir (para gene AHAS), glufosinato (para o gene bar) ou D-serina (para o gene dsdA). Os brotos regenerados foram subcultivados em meio de alongamento com o agente seletivo.

[00260] Para regeneração de plantas transgênicas os segmentos foram então cultivados em um meio com citocininas como BAP, TDZ e/ou cinetina para indução de broto. Após 4 a 8 semanas, os tecidos cultivados foram transferidos para um meio com baixa concentração de citocinina para alongamento de broto. Brotos alongados foram transferidos para um meio com auxina para desenvolvimento de raízes e plantas. Múltiplos brotos foram regenerados.

[00261] Muitos setores transformados estáveis e com forte expressão de cDNA foram recuperados. Plantas de soja foram regeneradas a partir de explantes epicótilos. Oferta eficiente de T-DNA e setores transformados estáveis foram demonstrados.

3.3.3 MÉTODO B: EXPLANTES FOLIARES

[00262] Para a preparação do explante foliar, o cotilédone foi removido do hipocótilo. Os cotilédones foram separados um do outro e o epicótilo é removido. As folhas primárias, que consistem na lâmina, o pecíolo e as estípulas, foram removidas do epicótilo cuidadosamente por corte na base das estípulas, de modo que os meristemas axilares foram incluídos no explante. Para ferir o explante, bem como para estimular a formação de novos brotos, quaisquer brotos pré-formados foram removidos e a área entre as estípulas foi cortada com um bisturi afiado 3 a 5 vezes.

[00263] Os explantes são tanto completamente imersos como o final do pecíolo ferido mergulhado na suspensão de *Agrobacterium* imediatamente após a preparação dos explantes. Após a inoculação, os explantes são transferidos sobre filtro de papel estéril para remove remover o excesso de cultura *Agrobacterium* e colocar explantes com o lado ferido em contato com um cilindro de 7 cm de papel Whatman sobrepondo o meio CCM sólido (consulte acima). Esse filtro de papel previne crescimento excessivo de *A. tumefaciens* em explantes de soja. Enrolar cinco placas com Parafilm™ “M” (American National Can, Chicago, Ill., EUA) e incubar durante três a cinco dias no escuro ou na luz a 25°C.

3.3.4 MÉTODO C: MERISTEMA AXILAR PROPAGADO

[00264] Para a preparação do explante do meristema axilar propagado, explantes propagados de plântulas com 3 a 4 semanas de idade foram usados. Explantes de meristema axilar podem ser pré-preparados a partir do primeiro ao quarto nó. Uma média de três a quatro explantes pode ser obtida a partir de cada uma das mudas. Os explantes foram preparados a partir de plântulas por corte de 0,5 a 1,0 cm abaixo do nó axilar nos entrenós e remoção do pecíolo e da folha do explante. A ponta onde os meristemas axilares estavam foi cortada com um bisturi para induzir crescimento de novo do broto e permitir o acesso de células alvo para *Agrobacterium*. Portanto, um explante de 0,5 cm incluía o caule e um broto.

[00265] Uma vez cortados, os explantes foram colocados imediatamente em suspensão de *Agrobacterium* por 20 a 30 minutos. Após inoculação, os explantes foram transferidos para papel de filtro estéril para remover o excesso de cultura de *Agrobacterium*, em seguida, colocado quase completamente imersos em CCM sólido ou no topo de um papel de filtro redondo de 7 cm que se sobrepõe ao CCM sólido, dependendo da linhagem de *Agrobacterium*. Este papel de filtro impede o crescimento excessivo de

Agrobacterium nos explantes de soja. As placas foram embrulhadas com Parafilm™ “M” (American National Can, Chicago, Ill., EUA) e incubadas por dois a três dias no escuro a 25°C.

3.4 INDUÇÃO DE BROTO

[00266] Após 3 a 5 dias de cocultura no escuro a 25°C, os explantes foram lavados em meio líquido SIM (para remover o excesso de *Agrobacterium*) (SIM, consulte Olhoft *et al*, 2007 A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soy using primary-node explants from seedlings *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* (2007) 43:536-549, para remover o excesso de *Agrobacterium*) ou meio Modwash (1X sais principais B5, 1X sais menores B5, 1X MSIII de ferro, sacarose 3%, 1X vitaminas B5, MES 30 mM, 350 mg/L de Timentin™ pH 5,6, documento WO 2005/121345) e secos por absorção em papel de filtro estéril (para evitar danos, especialmente sobre a lâmina) antes da colocação no meio SIM sólido. Aproximadamente 5 explantes (Método A) ou de 10 a 20 (Métodos B e C) os explantes foram colocados de modo que o tecido alvo estava em contato direto com o meio. Durante as primeiras 2 semanas, os explantes puderam ser cultivados com ou sem meio seletivo. Preferencialmente, os explantes foram transferidos para SIM sem seleção durante uma semana.

[00267] Para explantes foliares (Método B), o explante deve ser colocado dentro do meio de modo que fique perpendicular à superfície do meio com o pecíolo embutido no meio da lâmina e fora do meio.

[00268] Para meristemas axilares propagados (Método C), o explante foi colocado no meio de modo que ficou paralelo à superfície do meio (basípeta) com o explante parcialmente embebido no meio.

[00269] Placas embaladas com fita de ventilação Scotch 394 (3M, St. Paul, Minn., EUA), foram colocadas em uma câmara de crescimento por duas semanas, com uma temperatura média de 25°C em 18 horas de luz/6

horas ciclo escuro em 70 a 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Os explantes permaneceram no meio SIM com ou sem seleção até que ocorreu crescimento de novo de brotos na área alvo (por exemplo, meristemas axilares no primeiro nó acima epicótilo). Transferências para o meio fresco podem ocorrer durante este tempo. Os explantes foram transferidos a partir do SIM, com ou sem seleção para o SIM com seleção, após cerca de uma semana. Neste momento, verificou-se considerável desenvolvimento de novo de brotos na base do pecíolo dos explantes de folhas em uma variedade de SIM (Método B), no nó principal para plântulas de explantes (Método A), e nos nós axilares de explantes propagados (Método C).

[00270] Preferencialmente, todos os brotos antes da transformação foram removidos até 2 semanas após a cocultura para estimular o crescimento novo dos meristemas. Isto ajudou a reduzir o quimerismo no transformante primário e aumentar a amplificação de células meristemáticas transgênicas. Durante este tempo o explante pode ou não ser cortado em pedaços menores (isto é, separando o nó do explante cortando o epicótilo).

3.5 ALONGAMENTO DE BROTO

[00271] Após 2 a 4 semanas (ou até que a massa da parte aérea fosse formada) em meio SIM (preferencialmente com a seleção), os explantes foram transferidos para o meio SEM (médio alongamento de brotos, consulte Olhoft *et al* 2007 A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soy using primary-node explants from seedlings. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* (2007) 43:536–549) que estimula o alongamento de brotos do broto primordiais. Este meio pode ou não conter um composto de seleção.

[00272] Após cada 2 a 3 semanas, os explantes foram transferidos para meio SEM fresco (preferencialmente contendo seleção) após cuidadosamente remover o tecido morto. Os explantes devem se manter juntos e não se fragmentar em pedaços e permanecerem saudáveis. Os explantes

continuaram a ser transferidos até o explante morrer ou os brotos se alongarem. Brotos alongados > 3 cm foram removidos e colocados em meio de RM de cerca de 1 semana (Método A e B), ou cerca de 2 a 4 semanas, dependendo do cultivar (Método C) no tempo em que as raízes começaram a se formar. No caso de explantes com raízes, estes foram transferidos diretamente para o solo. Brotos enraizados foram transferidos para o solo e endurecidos em uma câmara de crescimento durante 2 a 3 semanas antes da transferência para a estufa. As plantas regeneradas obtidas através deste método eram férteis e produziram, em média, 500 sementes por planta.

[00273] Após cinco dias de cocultura com *Agrobacterium tumefaciens*, a expressão transiente do gene de interesse (GOI) foi generalizada nos explantes de meristemas axilares de mudas, especialmente nas regiões feridas durante a preparação dos explantes (Método A). Os explantes foram colocados em meio de indução de brotos, sem seleção para verificar como o nó primário responde a indução e regeneração de brotos. Até o momento, mais de 70% dos explantes formaram novos brotos nesta região. A expressão de GOI era estável após 14 dias em SIM, o que implica a integração do T-DNA no genoma da soja. Além disso, experiências preliminares, resultaram na formação cDNA que expressam formadores de brotos, após 3 semanas em SIM.

[00274] Para o Método C, o tempo médio de regeneração de uma plântula de soja com o uso do protocolo meristema axilar propagados era de 14 semanas a partir da inoculação do explante. Portanto, este método tem um tempo de regeneração rápido, que conduz a plantas de soja férteis e saudáveis.

EXEMPLO 4

ENSAIO DE PATÓGENO

4.1. CULTIVO DE PLANTAS

[00275] 10 plantas T₁ por evento foram colocadas em potes e

cultivadas por 3 a 4 semanas em fitocâmara (ritmo de 16 h-dia e 8 h-noite em uma temperatura de 16 e 22°C e uma umidade de 75%) até as primeiras 2 folhas trifoliadas serem completamente expandidas.

4.2 INOCULAÇÃO

[00276] As plantas foram inoculadas com esporos de *P. pachyrhizi*.

[00277] A fim de obter material de esporos apropriados para a inoculação, as folhas de soja que foram infectadas com ferrugem entre 15 a 20 dias anteriores, foram tiradas de 2 a 3 dias antes da inoculação e transferidas para placas de ágar (ágar 1% em H₂O). As folhas foram colocadas com o seu lado superior sobre o ágar, o que permitiu que o fungo crescesse através do tecido e produzisse esporos muito jovens. Para a solução de inoculação, os esporos foram retirados das folhas e foram adicionados a uma solução de Tween-H₂O. A contagem de esporos foi realizada com um microscópio de luz, por meio de uma câmara de contagem Thoma. Para a inoculação das plantas, a suspensão de esporos foi adicionada a um frasco de pulverização operado com ar comprimido e aplicada uniformemente sobre as plantas ou nas folhas, até que a superfície da folha estivesse bem úmida. Para os ensaios macroscópicos usamos uma densidade de esporos de 1 a 5 x 10⁵ esporos/mL. Para os ensaios microscópicos é usada uma densidade de esporos >5 x 10⁵ esporos/mL. As plantas inoculadas foram colocadas durante 24 horas em uma câmara escura com uma média de 22°C e > 90% de umidade do ar. A cultura a seguir foi realizada em uma câmara com uma média de 25°C e 70% de umidade do ar.

EXEMPLO 5

TRIAGEM MICROSCÓPICA

[00278] Para a avaliação de desenvolvimento do patógeno, o inoculado das folhas das plantas foi manchado com azul de anilina após 48

horas de infecção.

[00279] A coloração com azul de anilina serve para a detecção de substâncias fluorescentes. Durante as reações de defesa nas interações de hospedeiro e interações não hospedeiro, substâncias como fenóis, calose ou lignina acumulada ou foram produzidos e foram incorporados na parede celular ou localmente em papilas ou em toda a célula (reação de hipersensibilidade, HR). Os complexos foram formados em associação com azul de anilina, por exemplo, que conduzem no caso da fluorescência da calose em amarelo. O material da folha foi transferido para pratos ou tubos falcon contendo solução de descoloração II (etanol/ácido acético a 6/1) e incubou-se em um banho-maria a 90°C por 10 a 15 minutos. A solução de descoloração II foi removida imediatamente, e as folhas foram lavadas 2x com água. Para a coloração, as folhas foram incubadas durante 1,5 a 2 horas em solução de coloração II (azul de anilina 0,05% = azul de metila, dihidrogenofosfato de potássio 0,067 M) e analisados por microscopia imediatamente depois.

[00280] Foram avaliados os diferentes tipos de interação (contados) por microscopia. Um microscópio Olympus UV BX61 (luz incidente) e um filtro UV LongPath (excitação: 375/15, divisor de feixe: 405 LP) são usados. Após coloração com azul de anilina, os esporos apareceram azuis sob luz UV. As papilas poderiam ser reconhecidas sob o apressório fúngico por uma coloração verde/amarelo. A reação de hipersensibilidade (HR) foi caracterizada pela fluorescência de células inteiras.

EXEMPLO 6

AVALIANDO A SUSCETIBILIDADE À FERRUGEM DA SOJA

[00281] A progressão da doença da ferrugem foi avaliada através da estimativa da área doente (área que foi coberta por esporulação de uredínia) na parte traseira (lado abaxial) da folha. Além disso, o amarelamento da folha foi levado em consideração (para o esquema, consulte a Figura 1).

[00282] Todas as 15 plantas de soja T0 que expressam a proteína MybTF foram inoculadas com esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Os sintomas macroscópicos da doença da soja contra o *P. pachyrhizi* de plantas de soja inoculadas foram pontuados 14 dias após a inoculação.

[00283] A média da porcentagem da área de folha mostrando colônias fúngicas ou amarelamento/acastanhado forte em todas as folhas foi considerada como área de folha doente. Todas as 15 plantas de soja T₀ que expressam MybTF (expressão verificada por RT-PCR) foram avaliadas em paralelo com plantas de controle não transgênicas. Plantas de soja não transgênicas cultivadas em paralelo às plantas transgênicas foram usadas como controle. A média da área foliar doente é mostrada na Figura 4 para as plantas que expressam a proteína MybTF recombinante, em comparação com plantas tipo selvagem. A superexpressão da MybTF reduz a área de folha doente em comparação com plantas de controle não transgênicas em 72,3% em média de todos os eventos e plantas geradas. Esses dados indicam claramente que a expressão in planta da construção de vetor de expressão de MybTF (consulte a Figura 2) leva a uma diminuição da doença de plantas transgênicas em comparação a controles não transgênicos. Logo, a expressão de ácido nucleico de MybTF (conforme mostrado na SEQ ID NO: 1) em soja aumenta significativamente ($p < 0,001$) a resistência de soja contra ferrugem.

EXEMPLO 7

CONSTRUÇÃO DE CASSETES DE EXPRESSÃO DE MILHO

[00284] A sequência de ácido nucleico que codifica os cDNAs otimizados de MYB-TF (conforme mostrado na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3) foram sintetizados de modo que um sítio de restrição Ascl estivesse localizado em frente do ATG de início e um sítio de restrição PstI a jusante do códon de parada. Os cDNAs sintetizados foram digeridos com o uso das enzimas de restrição Ascl e PstI (NEB Biolabs) e ligados em um vetor de transformação de

planta binário digerido por *AscI*/*PstI* (descrição abaixo) de uma forma que o cDNA de Myb-TF estivesse localizado na direção *sense* a jusante de um promotor SCBV254 (fragmento ScBV-254 do promotor do Vírus Baciliforme de Cana-de-Açúcar) e a montante de um terminador t-nos (3'UTR de Nopalina Sintase de *Agrobacterium tumefaciens*). Um íntron do gene Met1 de arroz também foi clonado entre o promotor e as sequências de cDNA de Myb-TF.

[00285] Foi usado um vetor de transformação de planta binário como esqueleto, o qual é composto de: (1) um cassete de resistência à Canamicina para seleção bacteriana, (2) uma origem pVS1 para replicação em *Agrobacteria*, (3) uma origem ColE1 de replicação para manutenção estável em *E. coli*, e (4) entre o limite direito e esquerdo de um gene ZmAHAS como marcador selecionável sob o controle de um promotor ZmAHAS.

[00286] Uma descrição completa dos componentes de um vetor binário de transformação de planta pode ser encontrada na literatura. Exemplos de vetores binários de plantas são pBi-nar (Höfgen & Willmitzer 1990, *Plant Sci.* 66:221-230), vetores pSUN300 ou pSUN2-GW e os vetores pPZP (Hajdukiewicz *et al.*, *Plant Molecular Biology* 25: 989-994, 1994).

[00287] Os vetores binários de transformação de planta contendo os cassetes de expressão de cDNA de Myb-TF foram transformadas em células Top10 (Invitrogen) com o uso de condições padrão. Células transformadas foram selecionadas em ágar LB contendo 50 µg/mL de canamicina, cultivadas durante a noite a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído com o uso do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A análise de clones subsequentes e o mapeamento de restrição foram realizados de acordo com as técnicas padrão de biologia molecular (Sambrook *et al.*, 1989, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

EXEMPLO 8**TRANSFORMAÇÃO DE MILHO**

[00288] Células de *Agrobacterium* que abrigam um plasmídeo contendo o gene de interesse (consulte acima) e o gene AHAS de milho mutado foram cultivadas em meio YP suplementado com antibióticos apropriados por 1 a 2 dias. Uma alça de células de *Agrobacterium* foi coletada e suspensa em 1,8 mL de meio M-LS-002 (LS-inf). As culturas foram incubadas, agitadas a 1.200 rpm por 5 min a 3 horas. As espigas de milho foram colhidas em 8 a 11 dias após a polinização. As espigas foram esterilizados em solução Clorox 20% por 5 min, seguido por pulverização com etanol 70% e então completamente lavadas com água estéril. Embriões imaturos de 0,8 a 2,0 mm de tamanho foram dissecados em um tubo contendo células de *Agrobacterium* na solução LS-inf.

[00289] Os constructos foram transformados nos embriões imaturos por um protocolo modificado a partir do método de transformação de planta mediado por *Agrobacterium* da Japan Tobacco (patentes US 5.591.616, 5.731.179, 6.653.529 e publicação de pedido de patente US 2009/0249514). Dois tipos de vetores plasmidiais foram usados para transformação. Um tipo tinha apenas um limite de T-DNA em cada um dos lados esquerdo e direito do limite, e o gene marcador selecionável e o gene de interesse estavam entre as bordas esquerda e direita do T-DNA. O outro tipo chamado de “constructos de dois T-DNA”, conforme descrito na patente US. 5.731.179 da Japan Tobacco. Nos dois constructos de DNA, o gene marcador selecionável estava localizado entre um conjunto de limites de T-DNA e o gene de interesse foi incluído entre o segundo conjunto de limites de T-DNA. Ambos os vetores plasmidiais foram usados. O vetor plasmidial foi eletroporado em *Agrobacterium*.

[00290] A infecção por *Agrobacterium* dos embriões foi realizada por inversão dos tubos várias vezes. A mistura foi derramada sobre um disco

de papel de filtro sobre a superfície de uma placa contendo meio de cocultivo (M-LS-011). A agrosolução líquida foi removida e os embriões foram verificadas através de um microscópio e colocados com o escutelo voltado para cima. Os embriões foram cultivados no escuro a 22°C por 2 a 4 dias, e transferidos para um meio M-MS-101 sem seleção e incubados por quatro a sete dias. Os embriões foram então transferidos para meio M-LS-202 contendo 0,75 µM de imazethapyr e cultivados por três semanas a 27°C para selecionar células do calo transformadas.

[00291] A regeneração da planta foi iniciada por transferência calos resistentes para o meio M-LS-504 suplementado com 0,75 µM de imazethapyr e cultivadas na luz a 26°C por duas a três semanas. Os brotos regenerados foram então transferidos para uma caixa de enraizamento com meio M-MS- 618 (0,5 µM de imazethapyr). As plântulas com raízes foram transferidas para uma mistura para vasos e cultivadas em sala de crescimento por uma semana, e então transplantadas para vasos maiores e mantidos em estufa até a maturidade.

[00292] A produção de plantas de milho transgênicas também é descrita, por exemplo, nas patentes US 5.591.616 e 6.653.529; publicação de pedido de patente US 2009/0249514; e documento WO/2006136596, cada um dos quais é incorporado ao presente pedido como referência. A transformação do milho pode ser feita com o uso da transformação por *Agrobacterium*, conforme descrito nas patentes US 5.591.616, 5.731.179, publicação de pedido de patente US 2002/0104132, e similares. A transformação do milho (*Zea mays* L.) também pode ser realizada com uma modificação do método descrito por Ishida *et al.* (*Nature Biotech.*, 1996, 14:745-750). A linhagem isogênica A188 (Universidade de Minnesota) ou híbridos com A188 como um progenitor são boas fontes de material de doação para transformação (Fromm *et al.*, *Biotech*, 1990, 8:833), mas outros genótipos também podem ser usados de maneira

bem sucedida. As espigas são colhidas das plantas de milho em aproximadamente 11 dias após a polinização (DAP) quando o comprimento de embriões imaturos é de cerca de 1 a 1,2 mm. Embriões imaturos são cocultivados com *Agrobacterium tumefaciens* que carregam os vetores “super binários” e as plantas transgênicas são recuperadas através de organogênese. O sistema de super vetor binário é descrito nos documentos WO 94/00977 e WO 95/06722. Os vetores são construídos conforme descrito. Vários genes marcadores de seleção são usados, incluindo o gene de milho que codifica uma enzima aceto-hidroxiácido sintase mutada (AHAS) (patente US 6.025.541). De maneira similar, vários promotores são usados para regular o gene de característica para fornecer regulação constitutiva, do desenvolvimento, induzível de regulação do tecido ou ambiental da transcrição de genes. Embriões removidos podem ser usados e podem ser cultivados em meio de indução de calo, então meio de regeneração de milho contendo imidazolinona como agente de seleção. As placas de Petri são incubadas na luz a 25°C por 2 a 3 semanas, ou até que os brotos se desenvolvam. Os caules verdes são transferidos de cada embrião para meio de enraizamento de milho e incubados a 25°C por 2 a 3 semanas, até que as raízes se desenvolvam. Os brotos enraizados são transplantados para o solo na estufa. Sementes T1 são produzidos a partir de plantas que exibem tolerância a herbicidas imidazolinonas e que são PCR positivos para os transgenes.

EXEMPLO 9

TRIAGEM DE RESISTÊNCIA A FUSARIUM E COLLETOTRICHUM

[00293] As plantas transgênicas de milho que expressam os cDNAs de Myb-TF cDNAs (SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3), sob o controle do promotor constitutivo SCBV254 (fragmento ScBV-254 de promotor de Vírus Baciliforme de cana-de-açúcar), foram cultivadas em estufa ou fitocâmaras sob condições padrão de crescimento em um ambiente controlado (20 a 25°C, 60 a

90% de umidade).

[00294] Pouco tempo depois as plantas transgênicas de milho entram na fase reprodutiva são inoculados perto da base do caule com uma suspensão de esporos fúngicos (10^5 esporos em solução de PBS) de *Fusarium* spp. e *Colletotrichum graminicola*. As plantas são incubadas por 2 a 4 semanas a 20 a 25°C e 60 a 90% de umidade.

[00295] Para pontuação da doença de podridão de raiz, os talos são divididos e a progressão da doença é pontuada por observação da característica de cor castanha para cor preta do fungo, conforme este cresce no talo. As classificações da doença são conduzidas por atribuição de um escore visual. Por experimento é pontuada a área foliar doente de mais de 10 plantas transgênicas (e plantas tipo selvagem como controle). Para a análise, a média da área foliar doente da planta mãe não transgênica é estabelecida para 100% para calcular a área foliar doente relativa das linhagens transgênicas.

[00296] A expressão do gene Myb-TF levará à resistência aumentada de milho contra *Fusarium* spp. e *Colletotrichum graminicola*.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA SOJA EM UMA PLANTA DE SOJA, uma parte da planta de soja ou célula vegetal de soja, caracterizado pelo método compreender a etapa de expressar, dentro de uma planta de soja, parte de planta de soja ou célula vegetal de soja, uma proteína heteróloga de fator de transcrição tipo Mioblastose (MybTF) que tem uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 7.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender:

(a) expressar dentro de uma célula vegetal de soja um cassete de expressão que codifica uma proteína heteróloga de acordo com a SEQ ID NO: 7 em ligação funcional com um promotor; e

(b) regenerar a planta de soja a partir da célula vegetal de soja.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo promotor ser um promotor constitutivo, promotor induzível por patógeno, um promotor mesófilo-específico ou um promotor epiderme-específico.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela resistência contra ferrugem da soja ser resistente contra *Phakopsora meibomiae* e/ou *Phakopsora pachyrhizi*.

5. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE SOJA TRANSGÊNICA, parte da planta de soja transgênica ou célula vegetal de soja transgênica tendo resistência aumentada contra ferrugem da soja, caracterizado por compreender:

(a) introduzir uma construção de vetor recombinante em uma planta de soja, uma parte da planta de soja ou uma célula vegetal de soja, em que a construção de vetor recombinante compreende:

(i) um ácido nucleico que codifica uma proteína heteróloga MybTF que tem uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 7, operavelmente ligado a

(ii) um promotor heterólogo, e

(iii) uma sequência de terminação de transcrição; e

(b) gerar uma planta de soja transgênica, parte da planta de soja transgênica ou célula vegetal de soja transgênica a partir da planta de soja, parte da planta de soja ou célula vegetal de soja.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ainda compreender a etapa de coletar as sementes da planta de soja transgênica, plantar as sementes e cultivar as sementes até plantas de soja, em que as plantas de soja cultivadas compreendem o ácido nucleico exógeno que codifica uma proteína heteróloga tendo uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 7.

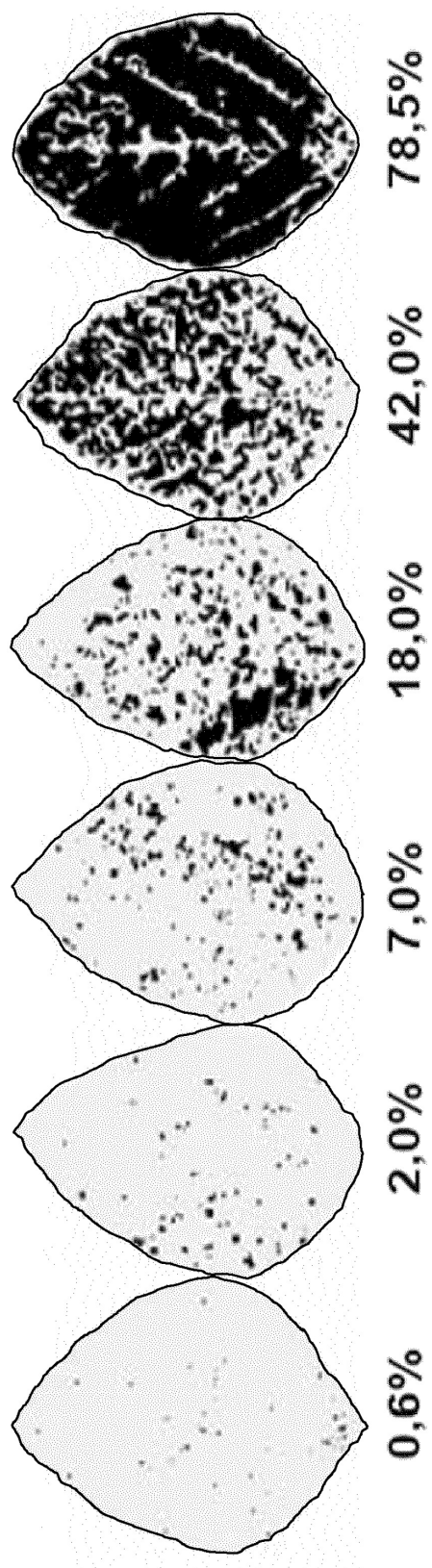
Fig. 1

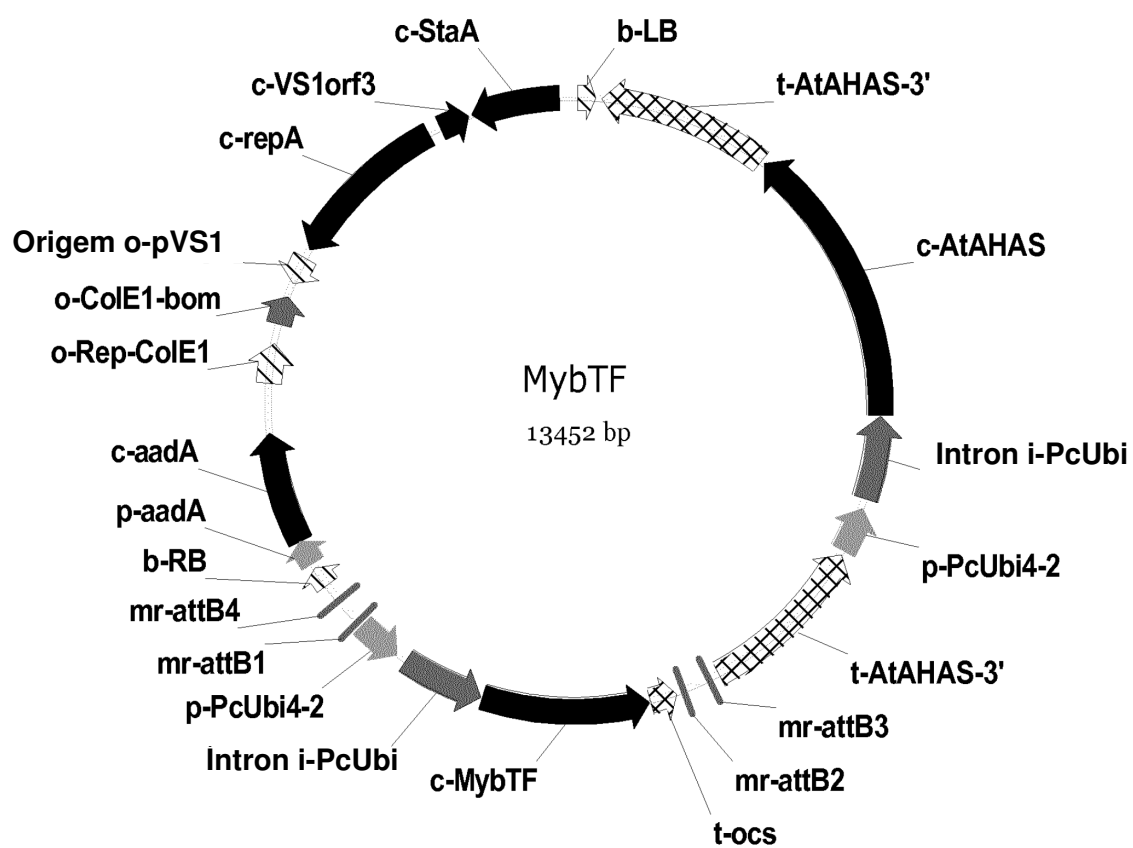
Fig. 2

Fig. 3

At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(1)	GTATATATGACACATTAGTTATAGAAGAGAGACTAACATGAAGATGGATTTTTCATGTTT	60
At3g29020.2-CDS	(1)	-----ATGAAGATGGATTTTTCATGTTT	
At3g20020.1-CDS	(1)	-----ATGAAGATGGATTTTTCATGTTT	
		-----ATGGATTTTTCATGTTT	
At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(61)	CCAAGAAATACCCCTTTTGAGTTTCATTGCAGAGGAACAACATTTAATGGGTTTAGAGAAAA	120
At3g29020.2-CDS	(24)	CCAAGAAATACCCCTTTTGAGTTTCATTGCAGAGGAACAACATTTAATGGGTTTAGAGAAAA	
At3g29020.2-CDS	(24)	CCAAGAAATACCCCTTTTGAGTTTCATTGCAGAGGAACAACATTTAATGGGTTTAGAGAAAA	
At3g20020.1-CDS	(18)	CCAAGAAATACCCCTTTTGAGTTTCATTGCAGAGGAACAACATTTAATGGGTTTAGAGAAAA	
		-----ATGGATTTTTCATGTTT	
At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(121)	CAATGCAGTGTCTGAAACAGTAGAAGAGTCTGTAAATAAAGAAGGATGCAGAAGAAGAG	180
At3g29020.2-CDS	(84)	CAATGCAGTGTCTGAAACAGTAGAAGAGTCTGTAAATAAAGAAGGATGCAGAAGAAGAG	
At3g29020.2-CDS	(84)	CAATGCAGTGTCTGAAACAGTAGAAGAGTCTGTAAATAAAGAAGGATGCAGAAGAAGAG	
At3g20020.1-CDS	(78)	CAATGCAGTGTCTGAAACAGTAGAAGAGTCTGTAAATAAAGAAGGATGCAGAAGAAGAG	
		-----ATGGATTTTTCATGTTT	
At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(181)	TGATGATTTGAAGACTAAGAAGAAGAAAGAAACAGAGTGTCTTAGGGTTTGTAGTAGAGG	240
At3g29020.2-CDS	(144)	TGATGATTTGAAGAACTAAGAAGAAGAAAGAAACAGAGTGTCTTAGGGTTTGTAGTAGAGG	
At3g29020.2-CDS	(144)	TGATGATTTGAAGACTAAGAAGAAGAAAGAAACAGAGTGTCTTAGGGTTTGTAGTAGAGG	
At3g20020.1-CDS	(138)	TGATGATTTGAAGACTAAGAAGAAGAAAGAAACAGAGTGTCTTAGGGTTTGTAGTAGAGG	
		-----ATGGATTTTTCATGTTT	
At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(241)	ACATTGGAGGATCTCTGAAGATACTCAGCTTATGGAGCTTGTTCGGTTTACGGTCCCTCA	300
At3g29020.2-CDS	(204)	ACATTGGAGGATCTCTGAAGATACTCAGCTTATGGAGCTTGTTCGGTTTACGGTCCCTCA	
At3g29020.2-CDS	(204)	ACATTGGAGGATCTCTGAAGATACTCAGCTTATGGAGCTTGTTCGGTTTACGGTCCCTCA	
At3g20020.1-CDS	(198)	ACATTGGAGGATCTCTGAAGATACTCAGCTTATGGAGCTTGTTCGGTTTACGGTCCCTCA	
		-----ATGGATTTTTCATGTTT	
At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(301)	AAACTGGAACCCACATTGCAGAGAGTATGCAAGGAAGAACAGGTAACGCAAAAAATTGAAA	360
At3g29020.2-CDS	(264)	AAACTGGAACCCACATTGCAGAGAGTATGCAAGGAAGAACAGGTAACGCAAAAAATTGAAA	
At3g29020.2-CDS	(264)	AAACTGGAACCCACATTGCAGAGAGTATGCAAGGAAGAACAG-----	
At3g20020.1-CDS	(258)	AAACTGGAACCCACATTGCAGAGAGTATGCAAGGAAGAACAG-----	
		-----ATGGATTTTTCATGTTT	
At3g29020 – genômico MybTF-DNA	(361)	TCTTTAATCTTCCCTTAGCTAATTCGGGAACATGAAACTTACAATGTTTTTCTTGCTTC	420
At3g29020.2-CDS	(324)	TCTTTAATCTTCCCTTAGCTAATTCGGGAACATGAAACTTACAATGTTTTTCTTGCTTC	
At3g29020.2-CDS	(305)	-----	
At3g20020.1-CDS	(299)	-----	

Fig. 3 (continuação)

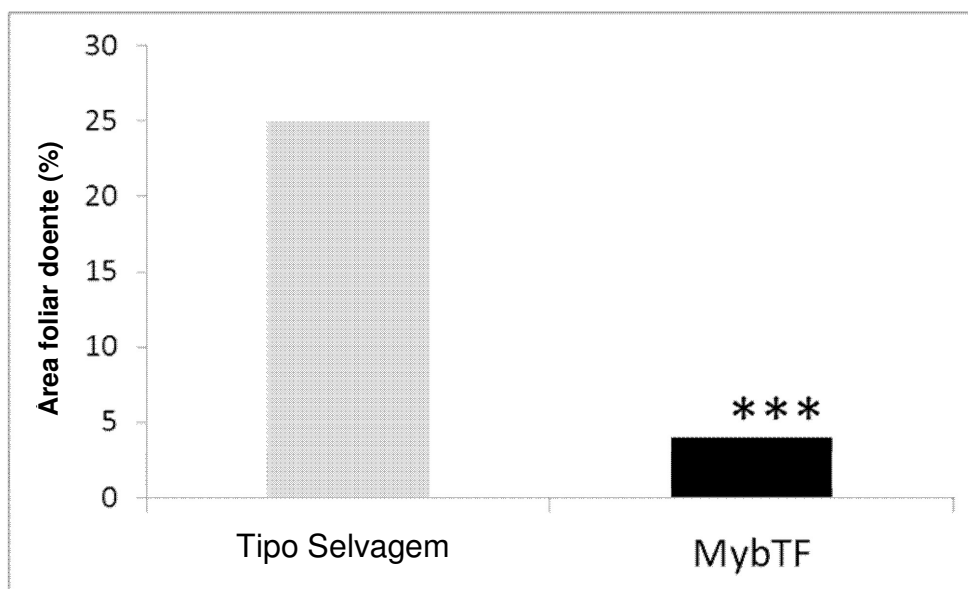
At3g29020 – genômico	(421)	421	TTTGTGTTTTTGTCTTAAAGGAAAGAGCTGCAGATTGAGGTGGTTTAAACCAGTTAGATCCG	480
MybTF-DNA	(384)		TTTGTGTTTTTGTCTTAAAGGAAAGAGCTGCAGATTGAGGTGGTTTAAACCAGTTAGATCCG	
At3g29020.2-CDS	(305)		-----GAAAGAGCTGCAGATTGAGGTGGTTTAAACCAGTTAGATCCG	
At3g29020.1-CDS	(299)		-----GAAAGAGCTGCAGATTGAGGTGGTTTAAACCAGTTAGATCCG	
At3g29020 – genômico	(481)	481	AGGATTAAACAAGAGAGCTTTTCAGTGATGAAGAAAGAGAGAGACTACTTGTGCTCATAGA	540
MybTF-DNA	(444)		AGGATTAAACAAGAGAGCTTTTCAGTGATGAAGAAAGAGAGAGACTACTTGTGCTCATAGA	
At3g29020.2-CDS	(346)		AGGATTAAACAAGAGAGCTTTTCAGTGATGAAGAAAGAGAGAGACTACTTGTGCTCATAGA	
At3g29020.1-CDS	(340)		AGGATTAAACAAGAGAGCTTTTCAGTGATGAAGAAAGAGAGAGACTACTTGTGCTCATAGA	
At3g29020 – genômico	(541)	541	GCTTTTGGTTAAACAAATGGGCTATGATTGCTAAGCTTTTCAATGGAAGAACAGATAATGCC	600
MybTF-DNA	(504)		GCTTTTGGTTAAACAAATGGGCTATGATTGCTAAGCTTTTCAATGGAAGAACAGATAATGCC	
At3g29020.2-CDS	(406)		GCTTTTGGTTAAACAAATGGGCTATGATTGCTAAGCTTTTCAATGGAAGAACAGATAATGCC	
At3g29020.1-CDS	(400)		GCTTTTGGTTAAACAAATGGGCTATGATTGCTAAGCTTTTCAATGGAAGAACAGATAATGCC	
At3g29020 – genômico	(601)	601	TTGGAAGAAATCATTTGGCATGTTCTCATGGCAAGGAAGATGAGACAGCAATCAAGTCTTTAC	660
MybTF-DNA	(564)		TTGGAAGAAATCATTTGGCATGTTCTCATGGCAAGGAAGATGAGACAGCAATCAAGTCTTTAC	
At3g29020.2-CDS	(466)		TTGGAAGAAATCATTTGGCATGTTCTCATGGCAAGGAAGATGAGACAGCAATCAAGTCTTTAC	
At3g29020.1-CDS	(460)		TTGGAAGAAATCATTTGGCATGTTCTCATGGCAAGGAAGATGAGACAGCAATCAAGTCTTTAC	
At3g29020 – genômico	(661)	661	GTCCAAAAGATTCAATGGTTCTGCTCATGAATCTAACACAGATCACAAAATCTTCAATCTTT	720
MybTF-DNA	(624)		GTCCAAAAGATTCAATGGTTCTGCTCATGAATCTAACACAGATCACAAAATCTTCAATCTTT	
At3g29020.2-CDS	(526)		GTCCAAAAGATTCAATGGTTCTGCTCATGAATCTAACACAGATCACAAAATCTTCAATCTTT	
At3g29020.1-CDS	(520)		GTCCAAAAGATTCAATGGTTCTGCTCATGAATCTAACACAGATCACAAAATCTTCAATCTTT	
At3g29020 – genômico	(721)	721	TCTCCTGGTTTGTCTCTTTCTTACCTTACACATATGCATTGAGTTTAACTCTGTTATTGTA	780
MybTF-DNA	(684)		TCTCCTGGTTTGTCTCTTTCTTACCTTACACATATGCATTGAGTTTAACTCTGTTATTGTA	
At3g29020.2-CDS	(586)		TCTCCTG-----	
At3g29020.1-CDS	(580)		TCTCCTGGTTTGTCTCTTTCTTACCTTACACATATGCATTGAGTTTAACTCTGTTATTGTA	
At3g29020 – genômico	(781)	781	ATGAGATACCTTTTCGATATTTATCACTCAGGAACAATGAACCTTATGGTTTGGTCTCAAAAG	840
MybTF-DNA	(744)		ATGAGATACCTTTTCGATATTTATCACTCAGGAACAATGAACCTTATGGTTTGGTCTCAAAAG	
At3g29020.2-CDS	(593)		-----	
At3g29020.1-CDS	(640)		ATGAGATACCTTTTCGATATTTATCACTCAGGAACAATGAACCTTATGGTTTGGTCTCAAAAG	

Fig. 3 (continuação)

At3g29020 – genômico	(841)	841	TAGTCAGATTGCAAGTTTGGTGAGTCTTTAAAGTTTCATGGTTCTGTGTGTTCTTTCAGGT	900
MybTF-DNA	(804)		TAGTCAGATTGCAAGTTTGGTGAGTCTTTAAAGTTTCATGGTTCTGTGTGTTCTTTCAGGT	
At3g29020.2-CDS	(593)		-----GT	
At3g29020.1-CDS	(700)		TAG-----	
At3g29020 – genômico	(901)	901	AAATGTAGATGATGATGAAGATGTGAATCTGAAAAAGTGCAGCTGGGAAAATGCTAAAAAGAG	960
MybTF-DNA	(864)		AAATGTAGATGATGATGAAGATGTGAATCTGAAAAAGTGCAGCTGGGAAAATGCTAAAAAGAG	
At3g29020.2-CDS	(595)		AAATGTAGATGATGATGAAGATGTGAATCTGAAAAAGTGCAGCTGGGAAAATGCTAAAAAGAG	
At3g29020.1-CDS	(703)		-----	
At3g29020 – genômico	(961)	961	GGAACCTACTAACCTGAAAGCTCAGTATCTCCAAGAAAGAAATATAGTTCTTCACGCATGCCG	1020
MybTF-DNA	(924)		GGAACCTACTAACCTGAAAGCTCAGTATCTCCAAGAAAGAAATATAGTTCTTCACGCATGCCG	
At3g29020.2-CDS	(655)		GGAACCTACTAACCTGAAAGCTCAGTATCTCCAAGAAAGAAATATAGTTCTTCACGCATGCCG	
At3g29020.1-CDS	(703)		-----	
At3g29020 – genômico	(1021)	1021	ATGCAGGGTCCACATCATCACTACTCAACCTTCCCTGCAGATTCCCTTGGCACTGACACTG	1080
MybTF-DNA	(984)		ATGCAGGGTCCACATCATCACTACTCAACCTTCCCTGCAGATTCCCTTGGCACTGACACTG	
At3g29020.2-CDS	(715)		ATGCAGGGTCCACATCATCACTACTCAACCTTCCCTGCAGATTCCCTTGGCACTGACACTG	
At3g29020.1-CDS	(703)		-----	
At3g29020 – genômico	(1081)	1081	CATGCTCTCCATCCAGGAACCATCATCATCATCGTCAATATCACTGCCCATCATCAACA	1140
MybTF-DNA	(1044)		CATGCTCTCCATCCAGGAACCATCATCATCATCGTCAATATCACTGCCCATCATCAACA	
At3g29020.2-CDS	(775)		CATGCTCTCCATCCAGGAACCATCATCATCATCGTCAATATCACTGCCCATCATCAACA	
At3g29020.1-CDS	(703)		-----	
At3g29020 – genômico	(1141)	1141	ACTGGAGAACATACAAATGGTGACCAGATATTTTGAGACCATTAAACCTCCAGCATTTATA	1200
MybTF-DNA	(1104)		ACTGGAGAACATACAAATGGTGACCAGATATTTTGAGACCATTAAACCTCCAGCATTTATA	
At3g29020.2-CDS	(835)		ACTGGAGAACATACAAATGGTGACCAGATATTTTGAGACCATTAAACCTCCAGCATTTATA	
At3g29020.1-CDS	(703)		-----	
At3g29020 – genômico	(1201)	1201	GATTTTCTAGGAGTTGGTCACTAAAGCTCTAACAATTTTAGAGTGGGAACATAATCAAGAAGT	1260
MybTF-DNA	(1164)		GATTTTCTAGGAGTTGGTCACTAAAGCTCTAACAATTTTAGAGTGGGAACATAATCAAGAAGT	
At3g29020.2-CDS	(895)		GATTTTCTAGGAGTTGGTCACTAAAGCTCTAACAATTTTAGAGTGGGAACATAATCAAGAAGT	
At3g29020.1-CDS	(703)		-----	

Fig. 3 (continuação)

At3g29020 – genômico	(1261)	1261	1320
MybTF-DNA	(1188)	TGCTTACTCCGTGCATTATTATCAAAAGTCTCTGACTTTTCTTTTGTAGCCATTAAACATG	
At3g29020.2-CDS	(919)	-----	-----
At3g20020.1-CDS	(703)	-----	-----
		-----	-----
At3g29020 – genômico	(1321)	1321	1340
MybTF-DNA	(1188)	ACAAGCTAAAGACATCAAGT	
At3g29020.2-CDS	(919)	-----	-----
At3g20020.1-CDS	(703)	-----	-----

Fig. 4**Fig. 5**

SEQ ID NO:	Descrição da Lista de Sequências
1	Sequência de nucleotídeos do gene MybTF; <i>Arabidopsis thaliana</i>
2	Sequência de nucleotídeos da sequência codificadora otimizada CDS1 do gene MybTF, que é códon otimizada para ótima expressão na soja (<i>Glycine max</i>)
3	Sequência de nucleotídeos da sequência codificadora otimizada do gene MybTF, que é códon otimizada para ótima expressão na soja (<i>Glycine max</i>)
4	Sequência de nucleotídeos da segunda sequência CDS (CDS2) (At3g29020.2, TAIR acesso nº 4010715313) do gene MybTF derivado da sequência genômica; <i>Arabidopsis thaliana</i>
5	Sequência de aminoácidos da proteína MybTF, como derivada da sequência de nucleotídeos CDS2, <i>Arabidopsis thaliana</i>
6	Sequência de nucleotídeos da primeira sequência CDS (CDS1) (At3g29020.1, acesso nº NM_113823) do gene MybTF derivado da sequência genômica; <i>Arabidopsis thaliana</i> ;

Fig. 5 continuação

7	Sequência de aminoácidos da proteína MybTF derivada da sequência de nucleotídeos de CDS1, Arabidopsis thaliana
8	Sequência de nucleotídeos da sequência genômica de MybTF inteira (TAIR acesso nº 4010724011)
9	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 1
10	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 2
11	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 3
12	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 4
13	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 5
14	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 6
15	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 7
16	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 8
17	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 9
18	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 10
19	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 11
20	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 12
21	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 13
22	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 14
23	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 15
24	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 16
25	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 17
26	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 17
27	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 18
28	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 18
29	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 19
30	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 19
31	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 20
32	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 20
33	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 21
34	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 21
35	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 22
36	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 22
37	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 23
38	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 23
39	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 24
40	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 24
41	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 25
42	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 25

Fig. 5 continuação

43	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 26
44	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 26
45	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 27
46	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 27
47	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 28
48	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 28
49	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 29
50	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 29
51	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 30
52	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 30
53	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 31
54	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 31
55	Sequência de nucleotídeos MybTF, variante 32
56	Sequência de aminoácidos MybTF, variante 32