(11) Número de Publicação: **PT 1054985 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/82 (2011.01) ***A01H 1/02*** (2011.01)
A01H 5/00 (2011.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.01.22**

(30) Prioridade(s): **1998.02.20 GB 9803659**
1998.03.17 GB 9805669

(43) Data de publicação do pedido: **2000.11.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.04.18**
126/2012

(73) Titular(es):
SYNGENTA LIMITED
EUROP.REG.CTR.PRIESTLEY RD.,SURREY RESEARCH PARK GUILDFORD SURREY GU2 7YH **GB**

(72) Inventor(es):
MARY ELIZABETH KNIGHT **GB**
IAN JEPSON **GB**
ALLAN DALY **GB**
MICHAEL WILLIAM BAYLISS **GB**

(74) Mandatário:
MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE SEMENTE HÍBRIDA**

(57) Resumo:
SÃO DESCRITOS MÉTODOS PARA PREPARAR SEMENTES HÍBRIDAS. UM TAL MÉTODO COMPREENDE A INTERPLANTAÇÃO DE UMA PLANTA PROGENITORA MASCULINA QUE É UM MASCULINA FÉRTIL E FEMININA HOMOZIGÓTICA RECESSIVA ESTÉRIL E UMA PLANTA PROGENITORA FEMININA A QUAL É MASCULINA HOMOZIGÓTICA RECESSIVA ESTÉRIL E FEMININA FÉRTIL, PERMITINDO POLINIZAÇÃO CRUZADA E OBTENDO A SEMENTE DAÍ PRODUZIDA. O MATERIAL GENÓMICO DE CADA PLANTA PROGENITORA PODE TAMBÉM TER NELE INTEGRADO UMA CONSTRUÇÃO DE GENE COMPREENDENDO UMA SEQUÊNCIA PROMOTORA RESPONSIVA À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM INDUTOR QUÍMICO EXÓGENO, OPERÁVEL OPCIONALMENTE LIGADO A UM OU MAIS POTENCIADORES OU SEQUÊNCIAS DE INTRÃO, OPERACIONALMENTE LIGADO A UM GENE QUE RESTABELECE A FERTILIDADE DE CADA PLANTA PROGENITORA, SENDO O GENE EXPRESSO PELA APLICAÇÃO À PLANTA DE UM INDUTOR QUÍMICO EXTERNO PERMITINDO ASSIM A CADA PROGENITOR AUTOPOLINIZAR-SE.

RESUMO

"PRODUÇÃO DE SEMENTE HÍBRIDA"

São descritos métodos para preparar sementes híbridas. Um tal método compreende a interplantação de uma planta progenitora masculina que é um masculina fértil e feminina homozigótica recessiva estéril e uma planta progenitora feminina a qual é masculina homozigótica recessiva estéril e feminina fértil, permitindo polinização cruzada e obtendo a semente daí produzida. O material genómico de cada planta progenitora pode também ter nele integrado uma construção de gene compreendendo uma sequência promotora responsiva à presença ou ausência de um indutor químico exógeno, operável opcionalmente ligado a um ou mais potenciadores ou sequências de intrão, operacionalmente ligado a um gene que restabelece a fertilidade de cada planta progenitora, sendo o gene expresso pela aplicação à planta de um indutor químico externo permitindo assim a cada progenitor autopolinizar-se.

DESCRIÇÃO

"PRODUÇÃO DE SEMENTE HÍBRIDA"

A presente invenção relaciona-se com métodos para preparar sementes híbridas.

Em particular, a presente invenção relaciona-se com o controlo molecular e esterilidade em plantas de cultivo. Essa esterilidade masculina e feminina em plantas pode ser usada na preparação de semente híbrida de culturas as quais são naturalmente auto-polinizadoras.

A presente invenção relaciona-se também com cassetes de expressão por incorporação em plantas e para uso dessas cassetes de expressão no sistema de restabelecer a esterilidade macho/fêmea.

Plantas híbridas crescidas a partir de sementes híbridas beneficiam dos efeitos heteróticos do cruzamento de duas origens genéticas distintas. A produção de semente híbrida depende da capacidade para controlar a autopolinização e assegurar a polinização cruzada das plantas progenitoras masculinas e femininas.

Vários métodos estão disponíveis para controlar a fertilidade do pólen. Por exemplo, no caso do milho, o qual tem flores masculinas e femininas separadas, o controlo da fertilidade do pólen é alcançada removendo fisicamente a inflorescência masculina ou bandeira, antes da ântese, prevenindo assim a autopolinização.

A maioria das culturas principais, porém, tem os dois órgãos reprodutivos masculino e feminino funcionais na

mesma flor. Neste caso, a remoção de pólen dos órgãos produtores é muito trabalhosa e dispendiosa. O uso de químicos (gametocidas), particularmente em trigo, milho (milho) e arroz, para matar ou bloquear a produção de pólen produz transitoriamente esterilidade masculina mas o uso desses químicos é dispendioso. A fiabilidade dos químicos e o seu âmbito de ação são também uma questão.

Há considerável interesse em desenvolver sistemas de controlo de pólen com base em mecanismos genéticos produzindo esterilidade masculina. Há dois tipos gerais: a) esterilidade masculina nuclear causada pela falha de produção de pólen devido a um ou mais genes nucleares e b) esterilidade masculina citoplásmica (CMS) na qual a produção de pólen é bloqueada devido a um defeito no gene na mitocôndria. Exemplos de sistemas de esterilidade usando mecanismos genéticos são divulgados nas EP412006, WO9627673, EP412911, WO961135, WO941255 e EP 344029.

Sistemas nucleares atualmente disponíveis são baseados na introdução de uma característica de esterilidade masculina numa planta progenitora seguida da introdução de um gene restaurador de fertilidade como resultado da polinização cruzada com outra planta para produzir plantas híbridas férteis. O sistema Paladin, o qual é descrito na WO96/01799 é diferente e é baseado na separação durante a produção de genes de semente híbrida as quais, quando expressada em conjunto numa planta, tem um efeito citotóxico que conduz à esterilidade masculina.

Arroz e trigo são plantas autopolinizadoras e têm pequenas flores hermafroditas e assim a abordagem ao desbandeiramento tomado para a produção de semente híbrida no milho não é aplicável. A remoção manual das anteras é difícil e demorada. Mais ainda, o pólen de trigo é

relativamente pesado e é viável somente durante um curto prazo, raramente permanece viável durante mais de 30 minutos. A técnica de plantação usada na produção de milho híbrido i.e. plantação do progenitor masculino num bloco fisicamente separado do progenitor feminino (o masculino estéril) e viabilizando a polinização pelo vento, no entanto, não trabalha bem em trigo ou arroz. Os progenitores masculino e feminino para essas culturas têm que ser interplantados para garantir polinização cruzada. Dado que as sementes híbridas necessitam de incluir mais de 95% de híbridos, é necessário remover as sementes formadas a partir da autopolinização do progenitor masculino ou com o progenitor masculino ou tornar o progenitor masculino incapaz de auto-fertilização e portanto incapaz de produzir semente não híbrida. Claramente, a interplantação das plantas progenitoras significa que a primeira opção é difícil a menos que as plantas masculinas sejam suscetíveis para algum tratamento químico ao qual o progenitor feminino é tolerante por exemplo tratamento herbicida.

O nosso Pedido de Patente Internacional No. PCT/GB90/00110 (WO90/0883) descreve uma cascata de sequências de genes que expressa uma proteína a qual interrompe a biossíntese do pólen viável numa planta progenitora feminina. Neste caso, porém, somente uma das plantas progenitoras i.e. o progenitor feminino é estéril para minimizar a autopolinização da planta feminina e esta planta feminina é cruzada com uma planta progenitora masculina fértil para produzir semente híbrida fértil. Porém, não há descrições na literatura de um método de produção de semente híbrida em que ambas as plantas progenitoras são incapazes de se autopolinizarem.

A presente invenção relaciona-se com um método pelo qual a semente híbrida pode ser produzida a qual procura

ultrapassar os problemas presentemente associados com a produção de semente híbrida, particularmente com a produção de semente de trigo e arroz híbrida.

De acordo com um primeiro aspeto da presente invenção é fornecida uma expressão de cassetes compreendendo:

(a) uma primeira sequência promotora do gene a qual é uma promotora específica de tapete, antera, estame e/ou pólen;
(b) um gene desregulador que codifica um produto capaz de desregular a fertilidade masculina operativamente ligada ao primeiro gene promotor;
(c) uma segunda sequência promotora de gene que é uma, transmissora de trato de um ovário, óvulos, pistilo, estilete, estigma da flor e/ou promotor específico de placenta opcionalmente operativamente ligado com um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão;
(d) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade feminina operativamente ligado à segunda sequência promotora de gene;
(e) uma terceira sequência promotora que é indutível pela aplicação de um indutor químico exógeno opcionalmente operativamente ligada com um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão; e
(f) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade masculina operativamente ligado a uma segunda sequência promotora de gene.

De acordo com um segundo aspeto da presente invenção é fornecida uma expressão de cassetes compreendendo:-

(a) um primeiro promotor de gene o qual é um transmissor de trato e/ou promotor específico de placenta de ovário, óvulo, pistilo, estilete, estigma da flor;
(b) um gene desregulador que codifica um produto capaz de desregular a fertilidade feminina operativamente ligada ao primeiro gene promotor;
(c) um segundo promotor de gene o qual é um promotor específico de tapete, anteras, estames e/ou pólen opcionalmente operativamente ligados a um ou mais potenciador ou sequências de intrão;
(d) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade masculina operativamente ligado a um segundo promotor de gene;
(e) um terceiro promotor que é indutível pela aplicação de um indutor químico exógeno opcionalmente operativamente ligado com um ou mais potenciadores ou sequências de intrão; e
(f) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade feminina operativamente ligado a um terceiro promotor de gene.

É fornecido um método de produção de semente híbrida compreendendo:

(a) incorporar uma cassete de expressão de acordo com o primeiro aspeto da presente invenção na primeira planta para gerar uma planta progenitora feminina hemizigótica, aplicando um indutor químico exógeno à planta progenitora feminina permitindo deste modo que a planta progenitora feminina se autopolinize, obtendo semente a partir da referida planta

progenitora feminina e selecionando a planta progenitora feminina, crescida a partir da referida semente, que é homozigótica para a referida cassete de expressão;

(b) incorporar uma cassete de expressão de acordo com um segundo aspeto da presente invenção numa segunda planta para gerar uma planta progenitora masculina hemizigótica, aplicando um indutor químico exógeno à planta progenitora masculina permitindo deste modo à planta progenitora masculina autopolinizar-se, obtendo semente a partir da referida planta progenitora masculina e selecionando uma planta progenitora masculina, crescida a partir da referida semente, que é homozigótica para a referida cassete de expressão;

(c) cruzar a planta masculina homozigótica selecionada da parte (b) e a planta feminina homozigótica da parte (a); e

(d) recolher a semente híbrida produzida no progenitor feminino

É fornecido tecido de planta transformado tanto com uma das cassetes de expressão como definido acima como com material derivado do referido tecido de planta transformado.

São fornecidas plantas inteiras férteis compreendendo o tecido ou material como definido acima.

É fornecida a descendência das plantas selecionadas a descendência produzida compreendendo cassetes de expressão incorporadas como definido acima, preferencialmente incorporadas estavelmente, no seu genoma e as sementes dessas plantas e essa descendência.

De acordo com um aspeto da presente invenção, é fornecida uma planta, o genoma da qual compreende a primeira cassete de expressão de acordo com o primeiro aspeto da presente invenção.

De acordo com um aspeto da presente invenção, é fornecida uma planta, o genoma da qual compreende a segunda cassete de expressão de acordo com o segundo aspeto da presente invenção.

É adicionalmente divulgada semente híbrida produzida por cruzamento dessas duas plantas e obtendo a resultante semente híbrida produzida a partir delas.

É fornecido o uso de uma planta de acordo com a presente invenção para produzir semente híbrida.

É adicionalmente divulgado um método para transformar uma planta compreendendo incorporar no genoma da planta uma cassete de expressão como definido acima em que o restaurador de gene, o qual é operativamente ligado a uma terceira sequência promotora, é indutivelmente expressa no tecido alvo mas pode ser constitutivamente expressa num ou mais outros tecidos de modo a que o gene desregulador é eficaz somente no tecido alvo. A terceira sequência promotora pode ser constitutivamente expressa num determinado estágio por exemplo no tecido caloso.

Preferencialmente, a primeira cassete de expressão definida acima e usada no método compreende um gene desregulador que codifica um produto o qual é capaz de desregular a produção de pólen.

Preferencialmente, a primeira cassete de expressão definida acima compreende um gene desregulador que codifica um

produto o qual é capaz de ser expresso nas células do tapete da planta.

Preferencialmente, a terceira sequência promotora de gene na primeira cassete de expressão é a sequência promotora Alc A ou a sequência promotora GST-27.

Preferencialmente, a segunda cassete de expressão definida acima e usada no método compreende um gene restaurador que codifica um produto o qual é capaz de restabelecer a produção de pólen.

Preferencialmente, a segunda cassete de expressão definida acima compreende um gene restaurador o qual é capaz de superar rompimento das células do tapete.

Preferencialmente, a terceira sequência promotora de gene na segunda cassete de expressão é a sequência promotora Alc A ou a sequência promotora GST-27.

Preferencialmente, as plantas masculinas no método compreendem um gene dominante homozigótico que restabelece a fertilidade masculina.

Preferencialmente, as plantas femininas no método compreendem um gene dominante homozigótico que restabelece a fertilidade feminina.

Preferencialmente, a semente híbrida F1 produzida dá origem a plantas, cujas anteras produzem aproximadamente 50% de pólen viável, em que a primeira sequência promotora de gene da primeira cassete de expressão como definido acima é uma sequência promotora gametofítica.

Preferencialmente, a semente híbrida F1 produzida dá origem a plantas, em que todas elas são totalmente férteis quando a primeira sequência promotora da primeira cassete de expressão como definido acima é uma sequência promotora esporofítica.

Preferencialmente a semente híbrida F2 dá origem a plantas as quais segregam quanto à esterilidade, das quais uma quantidade significativa são femininas estéreis.

Preferencialmente as plantas homozigóticas masculinas e femininas produzidas pelo método são multiplicadas e mantidas através da aplicação às plantas de um indutor químico exógeno, permitindo deste modo que as plantas se autopolinizem. Neste sentido, as novas gerações da autopolinização das plantas homozigóticas masculinas e femininas selecionadas podem ser produzidas e quando a semente híbrida é necessária, as plantas podem ser cruzadas para se obter semente híbrida.

Preferencialmente, as plantas usadas no método são trigo, cevada, arroz, milho, beterraba sacarina, tomate, girassol, canola, algodão, soja e outros vegetais.

Preferencialmente, o restaurador de gene usado no método para transformar uma planta é constitutivamente expresso no tecido caloso a partir do qual as plantas transformadas são regeneradas.

Preferencialmente, o restaurador de gene é indutivelmente expresso nas estruturas masculinas e femininas da flor.

Preferencialmente, a terceira sequência promotora de gene das cassetes de expressão usadas no processo de transformação são as sequências promotoras GST-27 ou Alc A.

É adicionalmente divulgado um método de preparação de semente híbrida compreendendo interplantação de uma planta progenitora masculina a qual é masculina fértil e feminina estéril homozigótica recessiva e a planta progenitora Feminina é homozigótica recessiva masculina estéril e feminina fértil, permitindo a polinização cruzada e a obtenção de semente produzida a partir delas em que o DNA genómico de cada planta progenitora tem nele integrada uma construção de gene compreendendo a sequência promotora responsiva à presença ou ausência de um indutor químico exógeno operativamente ligado a um gene o qual restaura totalmente a fertilidade de cada planta progenitora, o gene sendo expresso pela aplicação à planta de um indutor químico externo permitindo deste modo a cada patente autopolinizar-se quando necessário para multiplicação dos stocks de sementes de cada planta progenitora.

É adicionalmente divulgado um sistema de expressão compreendendo:-

(a) uma primeira sequência promotora do gene a qual é uma sequência específica promotora de flor masculina;
(b) um gene desregulador que codifica um produto capaz de desregular a fertilidade masculina operativamente ligada à primeira sequência promotora de gene;
(c) uma segunda sequência promotora de gene a qual é uma sequência específica promotora de tecido feminino opcionalmente operativamente ligada com um ou mais potenciador translacional ou sequências de intrão;
(d) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade feminina

operativamente ligado à segunda sequência promotora de gene;

(e) uma terceira sequência promotora responsiva à presença ou ausência de um indutor químico exógeno opcionalmente operativamente ligada com um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão;

f) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade masculina operativamente ligado a uma segunda sequência promotora de gene;

pela qual a presença do indutor químico exógeno controla a fertilidade masculina, em que o gene capaz de desregular a esterilidade masculina é um gene desregulador que codifica um produto o qual é expresso nas células do tapete da planta.

É adicionalmente divulgado um sistema de expressão compreendendo:-

(a) uma primeira sequência promotora do gene o qual é uma sequência específica promotora de tecido feminino;

(b) um gene desregulador que codifica um produto capaz de desregular a fertilidade feminina;

(c) uma segunda sequência promotora de gene a qual é uma sequência específica promotora de tecido masculino e opcionalmente operativamente ligada com um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão;

(d) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade masculina operativamente ligado à segunda sequência promotora de gene;

(e) uma terceira sequência promotora responsiva à presença ou ausência de um indutor químico exógeno opcionalmente ligada a um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão; e

(f) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade feminina operativamente ligado a uma segunda sequência promotora de gene;

pela qual a presença do indutor químico exógeno controla a fertilidade feminina e em que o gene capaz de restabelecer a fertilidade masculina é um gene que codifica um produto o qual restabelece a produção de pólen nas células do tapete.

As preferidas sequências específicas promotoras de flor masculina são as sequência promotoras MSF14 de milho e C5 (derivada da esterase metil pectina).

O termo "material vegetal" inclui uma cariopse em desenvolvimento, uma cariopse ou grão em germinação, ou uma estaca ou semente, uma plântula ou planta, ou tecidos ou células destas, tais como as células de uma cariópse em desenvolvimento ou os tecidos de uma semente em germinação ou grão ou planta em desenvolvimento (por exemplo nas raízes, folhas e caule).

O termo "cassete" o qual é sinónimo de termos tais como "construção", "híbrido" e "conjugado" inclui um gene de interesse direta ou indiretamente ligado a uma sequência promotora de gene. Um exemplo de uma ligação indireta é a provisão de um grupo espaçador adequado tal como um intrão ou uma sequência promotora intermediária do promotor e do gene de interesse. Tais construções incluem também plasmídeos e fagos os quais são adequados para transformar uma célula de interesse,

O termo "gene desregulador" é um gene que atua num modo dominante, e quando expresso num estádio adequado do desenvolvimento da planta, vai conduzir a que uma planta falhe na formação de estruturas florais normalmente funcionais ou em estruturas florais masculinas normalmente funcionais de modo que pode exercer o seu efeito na desregulação de tecidos tais como o tapete e o endotélio. O gene pode ser expresso especificamente em flores masculinas durante a formação de pólen causando a morte celular das anteras e tecidos associados. Pode também ser expressa no estigma ou no trato transmissor do estilete, interferindo assim no processo de adesão do pólen, hidratação, germinação do pólen e crescimento e orientação do tubo polínico. A origem dos genes desreguladores pode ser a partir de uma diversidade de fontes de ocorrência natural por exemplo células humanas, células bacterianas, células de leveduras, células vegetais, células de fungos, ou podem ser genes totalmente sintéticos os quais podem ser compostos de sequências de DNA, algumas das quais podem ser encontradas na natureza, algumas das quais não são normalmente encontradas na natureza ou uma mistura de ambas. Estes genes devem preferencialmente ter um efeito no metabolismo mitocondrial, dado que se sabe que um bom fornecimento de energia é uma exigência absoluta para a produção de pólen fértil. Os genes desreguladores podem, porém, ser efetivamente dirigidos para outras funções bioquímicas essenciais tais como metabolismo de DNA e RNA, síntese de proteína, e outros passos metabólicos. O gene desregulador dominante preferido é a barnase.

O termo "gene restaurador" é um gene que atua de modo dominante, e quando expresso, vai reverter os efeitos do gene desregulador. Um gene restaurador dominante preferido é barstar.

O termo "flor feminina" é entendido como incluindo mas não limitado a, ovário, óvulo, pistilo, estilete, estigma, trato de transmissão, placenta.

O termo "flor masculina"' é entendido para incluir todas as partes da flor masculina, incluindo mas não limitado a, o tapete, anteras, estames, pólen.

Os métodos de produção de semente híbrida são diferentes de e têm diversas vantagens em relação aos métodos existentes de vários modos. A utilização tanto da esterilidade masculina como da feminina não foi descrita anteriormente. Esta característica evita a autopolinização de qualquer dos progenitores permitindo assim a produção de semente híbrida sem a necessidade de blocos de sementeira separados para os progenitores masculinos e femininos. Esta interplantação das plantas progenitoras masculinas e femininas maximiza a oportunidade de polinização cruzada em culturas, tais como trigo e arroz, as quais são essencialmente autopolinizadoras. Nos exemplos de trigo e arroz, em que não é feita a plantação por blocos, este método permite a produção de semente híbrida sem a necessidade de aplicar herbicida para eliminar plantas progenitoras não desejados após fertilização do progenitor feminino. Um sistema de recuperação quimicamente indutível é necessário somente para a manutenção das linhas progenitoras homozigóticas em vez de para o processo de produção de semente híbrida. Isto significa que os químicos são aplicados de modo limitado e depois só raramente. Vários sistemas desregulador/ recuperador, ou sistemas operador-repressor podem ser usados na presente invenção.

Plantas contendo as cassetes de expressão da presente invenção as quais controlam a fertilidade masculina e feminina podem também ser usadas separadamente para fazer

híbridos F1 com outras linhas progenitoras, as quais não contêm a cassetes de expressão, se o controle de alternativa adequada de fertilidade masculina ou feminina (tais como remoção mecânica das anteras ou óvulos, ou uso de gametocidas químicos) é usado na outra linha. Se uma descendência destes híbridos F1 for então retrocruzada durante um número apropriado de gerações com outros progenitores híbridos, enquanto se selecionam quanto à presença de cassete de expressão com técnicas moleculares, bioquímicas ou de teste de descendência, o sistema para controlar a fertilidade masculina ou feminina pode ser transferido ou introgredido nas novas bases de progenitores. Alternativamente, híbridos F1 com outras linhas de progenitores podem ser autopolinizadas, através da aplicação de um indutor químico exógeno para restabelecer a fertilidade masculina ou feminina como apropriado, de modo a selecionar os novos progenitores híbridos contendo as cassetes de expressão, através do processo normal de melhoramento de plantas. O uso de uma tal introgressão e melhoramento de plantas vai permitir que os métodos de produção de semente híbrida da presente invenção sejam usados com uma larga variedade de novas e das existentes combinações de progenitores híbridos F1.

Promotores que são indutíveis por aplicação de químicos exógenos são conhecidos na técnica. Promotores indutíveis adequados são aqueles que são ativados através da aplicação de um químico, tal como um herbicida fitoprotetor. Exemplos de promotores indutíveis incluem os sistemas de mudança Alc A/R descritos na nossa Publicação internacional No. WO. 93/21334, o sistema de mudança GST descritos nas Publicações internacionais Nos WO 90/08826 e WO 93/031294 ou a mudança da ecdisona descrita na Publicação internacional No. WO 96/37609. Esses sistemas promotores são aqui referidos como "promotores de mudança". Os

químicos de mudança usados em conjunção com os promotores de mudança são químicos aceitáveis em agricultura que tornam estes promotores particularmente úteis nos métodos.

Uma das vantagens de usar o promotor Alc A, o qual é um componente do sistema de mudança Alc A/R, na presente invenção é que o indutor químico usado é etanol. Este químico é vantajoso porque pode ser aplicado como um banho de raiz, como um spray aquoso, ou como um gás. É eficaz em concentrações de 1% e não é tóxico para os operadores e para o ambiente.

A presente invenção pode ser útil para qualquer planta mono- ou di- cotiledónea que o melhorador ou o produtor queira para produzir as sementes híbridas F1 e para a qual estão ou podem estar disponíveis técnicas de transformação adequadas, particularmente culturas de trigo e arroz. A presente invenção tem a vantagem de reduzir os custos de manipulação das culturas associadas com a produção de semente híbrida F1, facilidade de controlo de pureza da semente híbrida e manutenção de linhas de progenitores.

Numa aplicação particular, a presente invenção relaciona-se com a produção de plantas progenitoras masculinas e femininas, as quais são tornadas estéreis usando técnicas de engenharia molecular. A esterilidade destas plantas pode ser revertida usando uma aplicação química que conduza ao restabelecimento da fertilidade.

As anteras são o sítio do processo reprodutivo masculino em plantas com floração. São compostas por vários tipos de tecidos e de células e são responsáveis pela produção de grãos de pólen que contêm as células espermáticas. O tapete é um tecido especializado que desempenha um papel crítico na formação do pólen. Ele cerca o saco polínico antes do

desenvolvimento do pólen, degenera durante os estádios de desenvolvimento tardios e não está presente de uma forma organizada na antera madura. O tapete produz vários compostos que ajudam o desenvolvimento do pólen ou são incorporados na parede externa do pólen e foi demonstrado que muitas das mutações da esterilidade masculina natural tem deficiente diferenciação do tapete ou função. Tecidos tapetais são portanto críticos para formação de grãos de pólen funcionais.

Vários genes foram identificados e clonados que são especificamente expressos no tecido do tapete. Incluem Osg6B, Osg4B (Tsuchiya *et al.* 1994, Yokoi, S *et al.* 1997), pE1, p T72 (WO9213957), p CA55 de milho (WO92/13956), TA29, TA13,(Seurinck *et al.* 1990), RST2 de milho (WO9713401), MS14,18,10 e A6, A9 de *Brassica napus* (Hird *et al.* 1993).

Um promotor específico de tapete isolado de arroz mostrou dar origem a plantas masculinas estéreis quando usado para conduzir a expressão de β 1,3 glucanase em tabaco, (Tsuchiya *et al.* 1995). O promotor específico de tapete TA29 foi usado para produzir tabaco masculino estéril (Mariani *et al.* 1990) e pCA55, pE1 e pT72 para produzir trigo masculino estéril (De Block *et al.* 1997) ao conduzirem a expressão de bamase.

Clones específicos de pólen foram obtidos a partir de várias espécies, incluindo milho (Hanson *et al.* 1989, Hamilton *et al.* 1989,) e tomate (Twell *et al.* 1990, 1991).

Outros clones específicos foram isolados a partir de várias espécies Bp4A e C de *Brassica napus* (Albani *et al.* 1990), chs de petúnia (Koes *et al.* 1989), arroz (Xu *et al.* 1993, Zou *et al.* 1994), entre outros.

Trigos homólogos destes clones e de outros podem ser obtidos através desses métodos como PCR degenerado, utilizando as sequências encontradas na literatura, e subsequente triagem do trigo e outras bibliotecas genómicas, e análise da especificidade dos tecidos usando a expressão de genes repórteres. Estes métodos estão bem documentados na literatura.

Nas plantas superiores os órgãos reprodutivos femininos estão representados pelo pistilo, composto do ovário, estilete e estigma. O gineceu foi demonstrado conter até 10.000 mRNAs diferentes não presentes noutros órgãos (Kamalay e Goldberg 1980). Isto inclui genes reguladores responsáveis por controlar o desenvolvimento do pistilo assim como "a jusante" os que codificam proteínas associadas com tipos de células indiferenciadas no pistilo. Genes que regulam a auto-incompatibilidade e seus homólogos são uma classe de genes com padrões de expressão predominante de pistilo (Nasrallah *et al.* 1993). Outros genes clonados incluem β glucanase (Ori *et al.* 1990), pectato liase (Budelier *et al.* 1990) e quitinase (Lotan *et al.* 1989) as quais são expressas no tecido de transmissão e um inibidor de proteinase (Atkinson *et al.* 1993) as quais são expressas no estilete. Outros estão relacionados com patogéneses ou são homólogos de genes envolvidos na clivagem de ligações glicosidicas. Estas enzimas podem facilitar o crescimento do tubo polínico através da digestão de proteínas nos tecidos através dos quais o tubo polínico cresce.

Vários mutantes estéreis femininos foram identificados em *Arabidopsis*. Por exemplo, sin1 (tegumento curto) (Robinson-Beers *et al.* 1992) e bel1 (bell) (Robinson-Beers *et al.* 1992) afetam o desenvolvimento do óvulo. A mutação

Aintegumenta bloqueia a megasporogénese na fase de tetra (Elliot,R.C, *et al.* 1996, Klucher,K.M, 1996). Uma mutação do óvulo 2 letal foi observada mas não clonada em milho (Nelson *et al.* 1952). Endoquitinases básicas específicas de pistilo de várias espécies (Ficker *et al.* 1997, Dzelzkalns *et al.* 1993, Harikrishna *et al.* 1996, Wemmer *et al.* 1994) e genes do tipo extensina mostraram ser expressos no estilete de *Nicotiana alata* (Chen C-G, *et al.* 1992).

Os seguintes são clones específicos de óvulos ZmOV23.13, (Greco R, *et al.* não publicado), OsOsMAB3A (Kang H.G., *et al.* I995), ZmZmM2 (Theissen G., *et al.* 1995) e stigl específico de estigma (Goldman, M.H *et al.* 1994), STG08, STG4B12 (EP-412006-A). Goldman *et al.* usou um promotor do gene STIG1 para conduzir a expressão de barnase na zona secretória estigmática. Isto conduz a flores sem zona secretora nos pistilos e portanto eram femininas estéreis. Os grãos de pólen foram capazes de germinar mas foram incapazes de penetrar a superfície.

Sete cDNAs específicos de óvulos foram isolados a partir de orquídea (Nadeau *et al.* 1996). Novamente, homólogos destes de trigo e quaisquer outros podem ser obtidos por técnicas de biologia molecular padrão.

É adicionalmente divulgada a identificação de genes com impacto sobre a esterilidade masculina e feminina. Tais genes podem ser usados numa variedade de sistemas para controlar a fertilidade.

O procedimento para marcar genes de milho com elementos de transposição foi revisto (Doring, 1989). Um dos métodos que podem ser usados é cruzar uma linha de milho que transporte os elementos de transposição ativos e um alelo dominante do

gene alvo com uma estirpe de milho normal que não carrega elementos de transposição. A descendência do cruzamento pode ser autopolinizada e rastreada para as mutações mais desejáveis, i.e. aqueles que conduzem à esterilidade. As plantas estéreis representam situações potenciais nas quais um elemento de transposição transpôs para um local envolvendo um gene essencial para a fertilidade. Os genes podem então ser recuperados numa diversidade de modos. A Petente US 5,478,369 descreve o isolamento por este método de um gene descrito como MS45.

Um gene de fertilidade masculina foi identificado em *Arabidopsis thaliana* usando o EnSpm-I/dSpm sistema de marcação de transposão para obter, um mutante de esterilidade masculina 2 (*ms2*) e o gene MS2 (Aarts *et al.* 1993). Este gene MS2 demonstrou estar envolvido numa gametogénese masculina, a síntese da parede celular não procede após meiose do micrósporo da célula mãe e os micrósporos são eventualmente degradados. Homólogos de MS2 foram identificados em *Brassica napus*, *Zea Mays* e com uma grelha de leitura aberta encontrada em DNA mitocondrial de trigo. O isolamento de genes críticos para a fertilidade em *Arabidopsis* pode portanto conduzir à clonagem de homólogos noutras espécies. Esta abordagem pode claramente ser tomada para isolar outros genes críticos para a fertilidade.

Atualmente há evidências da existência de regiões extensivas de colinearidade conservada entre espécies de gramíneas a nível genético. Ahn e Tanksley (1993) mostraram a relação entre arroz e milho e Kurata *et al.* (1994) mostraram que o genoma do trigo pode ser alinhado com o do arroz e Moore et a1 (1995) mostraram que todos os três mapas podem ser alinhados. Isto abre o caminho para o uso

de mapeamento comparativo do genoma como meios para isolar o gene.

A abordagem da microsintenia para clonagem de genes é baseada na semelhança emergente no marcador molecular e a ordem do gene entre as espécies evolutivamente relacionadas. Esta abordagem é particularmente atrativa para espécies de cereais de genoma grande com importância agrícola tal como trigo, milho e cevada que podem ter a vantagem do seu relativamente pequeno genoma, arroz. Kilian *et al.* (1997) relatam o progresso na clonagem com base num mapa dos genes da cevada Rpgl e rpg4 usando arroz como um veículo de mapeamento intergenómico.

Como a abordagem acima é limitada aos genes alvo que foram geneticamente mapeados, um método alternativo de isolamento de genes, que é um sistema de marcação de trasposão eficaz, está a ser desenvolvido em arroz usando o sistema Ac/Ds de milho, Izawa et al (1997).

Vários métodos têm sido sugeridos como sendo úteis para inativar genes necessários para a fertilidade ou para produzir compostos citotóxicos nos tecidos para evitar o desenvolvimento normal dos gametófitos.

O nosso pedido de patente internacional no. WO9942598 descreve um método para inibir a expressão de genes num tecido de planta alvo usando um desregulador de gene selecionado de UU\IT, tubulina, T-urf, subunidades ATP-ase, cdc25, ROA, MOT.

Existem vários outros sistemas de inativação conhecidos. Por exemplo, barnase (Mariani *et al.* 1990), toxina da difteria cadeia A, pectato liase. Dois exemplos de

compostos citotóxicos de expressão previamente descritos são a expressão de avidina e IamH/IamS.

A expressão de β1,3-glucanase nas células do tapete mostrou gerar plantas estéreis masculinas (Worrall *et al.* 1992). O anti-sentido foi proposto como um mecanismo através do qual a expressão de genes crítica para o desenvolvimento de pólen pode ser regulada para baixo e foi mostrado (Van der Meer 1992) que a inibição antisentido da biossíntese de flavonóides conduz evidentemente à esterilidade masculina. A redução da expressão do flavanol tem sido reivindicada em milho para resultar na esterilidade masculina (WO 93 18171 Pioneer Hi-Bred International). Outros mecanismos têm sido descritos (Spena *et al.* 1992).

Baulcombe (1997) descreve um método de silenciamento de gene em plantas transgénicas via do uso de vetores RNA virais replicáveis (Amplicons™) os quais podem também ser úteis como um meio de fazer cair a expressão de genes endógenos. Este método tem a vantagem de produzir uma mutação dominante i.e. é pontuável no estado heterozigótico e faz cair todas as cópias de um gene alvo e pode também fazer cair isoformas. Esta é uma vantagem clara em trigo o qual é hexaplóide. A fertilidade pode então ser restaurada usando um promotor indutível para conduzir a expressão de uma cópia funcional do gene caído.

Kempin *et al.* (1997) relatam a disrupção alvo de um gene funcional usando recombinação homologa. Este método normalmente, porém, produz uma mutação recessiva i.e. é pontuável somente no homozigoto. Para ser detetável no estado heterozigótico ele teria que ser diretamente letal ou, por exemplo, causar um bloqueio numa via de modo a que houvesse uma acumulação de compostos citotóxicos que conduzem à letalidade. Com vista a detetar a mutação de

esterilidade pode ser necessário para gerar um homozigoto recessivo por autopolinização, onde uma em quatro da descendência deve ser estéril. A construção de mudança permitindo a expressão do gene caído deve ter de ser introduzido num heterozigoto obtido pelo retrocruzamento do homozigoto. Isto é um método útil para gerar os mutantes recessivos necessários para o método mais tarde descrito no Exemplo 1.

As ribozimas são moléculas de RNA capazes de catalisar reações de clivagem endonucleolíticas. Podem catalizar reações de trans e podem ser direcionadas para diferentes sequências e portanto são alternativas potenciais para antisentido como um meio para modular a expressão dos genes (Hasselhof e Gerlach). Wegener et al (1994) demonstraram a geração de uma mutação trans-dominante pela expressão de um gene ribozima em plantas.

São conhecidos vários métodos para alterar os sistemas de auto incompatibilidade das plantas através da modificação da expressão do gene S como um meio de introduzir a esterilidade masculina pela qual uma planta é transformada com uma construção utilizando um gene S gametofítico que codifica uma ribonuclease de tal modo que uma planta auto incompatível é convertida em auto compatível ou a planta auto compatível é convertida em auto incompatível, evitando assim a auto polinização.

Exemplos de combinações de genes restauradores destruídos incluem barnase e barstar, e TPP e TPS. O uso do sistema barnase/barstar para gerar primeiramente esterilidade e depois restabelecer a fertilidade tem sido descrita (Mariani *et al.* (1992). A trealose fosfato fosfatase (TPP) quando expressa nas células do tapete de tabaco usando o promotor específico de tapete Tap 1 (Nacken et al 1991) de

Antirrhinum resulta na esterilidade masculina. Pensa-se que é um resultado da mudança do hidrato de carbono metabólico e capacidade fotossintética dos tecidos nos quais é expresso. As anteras mostram sinais de necrose e todo o pólen produzido está morto. O retrocruzamento com tabaco tipo selvagem resulta no desenvolvimento de semente normal. A análise da descendência mostra que a esterilidade segrega com o transgene. TreC, trealose-6-fosfato hidrolase é um segundo gene cuja expressão perturba os níveis de trealose-6-fosfato e foi demonstrado que quando ele é expresso usando o promotor constitutivo de plastocianina o resultado é a excisão do gomo antes da floração. Assim, se a expressão é limitada ao tapete, a esterilidade masculina pode resultar da mesma maneira como quando a TPP é expressa no tapete. Foi também demonstrado que após a aplicação de GA os gomos florais permanecem na planta e é produzido algum pólen conduzindo em alguns casos à produção de semente.

Foi também demonstrado que a expressão simultânea equimolar de trealose fosfato sintase (TPS) e TPP não produz qualquer efeito na fisiologia da planta i.e. TPS neutraliza o efeito de TPP no hidrato de carbono metabólico e na capacidade fotossintética dos tecidos nos quais são expressas. Foi também demonstrado que é possível restabelecer a fertilidade através da retransformação de linhas de tabaco estéreis como uma construção que expressa TPS no tapete. Claramente, a expressão de TPS pode também ser colocada sob controlo de um promotor indutível para permitir que a fertilidade seja restabelecida quando desejado, ou otimizar a aplicação de GA pode ser um meio alternativo para restabelecer a fertilidade. O promotor de um gene expresso especificamente nos tecidos que circundantes ou em, o óvulo, tal como o gene caixa MADS FBP7 pode ser usado para conduzir a expressão de TPP ou TreC para obter esterilidade

feminina. É provável que alguma otimização de uso de codão possa ser requerida para obter o mesmo efeito numa cultura monocotiledónea tal como trigo ou milho, (Merlo e Folkerts), (Seed e Haas).

O uso de uma quantidade de sistemas operador/repressor tenham sido descritos como um meio para controlar a expressão de genes em plantas. Wilde *et al.* demonstraram o uso do sistema *E. coli* lac para reprimir a expressão de GUS sob o controlo do promotor cab do milho (expressão lac I dirigida pelo promotor 35S CaMV). As sequências operadoras foram inseridas em várias posições dentro do promotor CAB e a extensão da repressão avaliada. Dependendo da posição das sequências operadoras, foi observada uma gama de repressão. Quando a sequência operadora foi incorporada por substituição entre a caixa TATA e o início da transcrição, foi obtida uma repressão de ~90%. Esta repressão pode ser aliviada pala adição de IPTG. Isto foi mostrado tanto em protoplastos de tabaco como em transformantes estáveis.

Lehming *et al.* relata que mudanças drásticas na afinidade de ligação podem ser alcançadas através da modificação de aminoácidos na hélice de reconhecimento do repressor lac originando assim um controlo mais apertado da expressão. Outros desses sistemas foram descritos e incluem o sistema promotor indutível de tetraciclina desenvolvido por Gatz *et al.* (1991, 1992) no qual um promotor 35S CaMV modificado é reprimido em plantas que expressam altos níveis da proteína do repressor de tetraciclina mas restabelece-o quando a tetraciclina é adicionada.

A indução esteróide da atividade de proteína pode originar um sistema de expressão indutível quimicamente o qual não sofre problemas de toxicidade química. Domínios de ligação

de ligandos de recetores esteróides de mamíferos e insetos tais como recetor glucocorticóide (GR), recetores estrogénios podem ser usados para regular a atividade de proteínas em células de mamífero (Picard *et al.* 1993). Um domínio de ligação a ligando fundido com uma proteína mantem a proteína num estado inativo até o ligando ser introduzido. Lloyd *et al.* (1994) descrevem uma fusão de um regulador transcricional de milho com GR. Simon *et al.* (1996) descrevem uma fusão de GR com um produto genético no tempo da floração de Arabidopsis responsável pela introdução da transcrição e Aoyama *et al.* (1995) descrevem a fusão de Gal4 ou VP16 com uma proteína de transativação, de planta Athb-1, colocada sob controlo esteróide por meio do domínio GR de ligação a ligando. É conhecido que a capacidade dos ativadores transcricionais para ligarem DNA e para simultaneamente ativarem a transcrição está localizada em domínios definidos desses fatores de transcrição. Foi demonstrado (Ptashne 1988) e Mitchell e Tijan (1989) que os fatores ativadores transcricionais são constituídos por módulos que funcionam independentemente. Ptashne e Gann (1980) e outros têm demonstrado que é possível combinar uma porção responsável pela ativação da transcrição de um fator com uma porção ligada ao DNA de outro fator e uma proteína híbrida resultante que é ativa em células de levedura. Um sistema que incorpore estes componentes pode ser usado para aliviar a repressão e assim induzir a expressão de genes de um modo controlado.

O uso de hormona juvenil ou um dos seus agonistas como um ligando químico para controlar a expressão de genes em plantas por transativação mediada por recetor tem também sido descrito.

Preferencialmente, o sistema de comutação usado com expressar indutivelmente o restaurador de gene é um sistema de comutação AlcA/R. Nós demonstrámos expressão indutível de GUS em anteras e pólen de tomate e introduzimos construções similares em trigo para demonstrar a expressão de GUS em tecido feminino e masculino usando o sistema de comutação AlcA/R. Nós também demonstrámos expressão de GUS indutível em pendões de milho, barbas, embrião e endosperma usando o sistema de comutação GST indutível protetor (Jepson *et al.* 1994). Outros sistemas de comutação podem evidentemente ser úteis na presente invenção.

A expressão de genes desreguladores ou citotóxicos durante a transformação de plantas como resultado de expressão de "indiscreta" a partir de promotores específicos de flores masculinas e femininas a um nível muito baixo em tecidos que não os tecidos alvo pode causar a morte celular e a não recuperação dos transformantes. Os promotores indutíveis usados na presente invenção para conduzir a expressão dos restauradores de genes pode oferecer alguma proteção contra esta possibilidade pelas razões a seguir.

No caso de o promotor GST-27, a expressão constitutiva foi observada em *callus*. No caso do promotor AlcA o qual é induzido com etanol, a indução da expressão de GUS foi observada em concentrações de 7ng/100mL de ar. Esta concentração de etanol pode ser adicionada ao meio de cultura de tecidos para assegurar a expressão do restaurador de gene.

Exemplos de combinações de genes desreguladores/restauradores incluem barnase e barstar, e TPP e TPS.

O uso de sequências translacionais potenciadoras, em particular a sequência TMV Ω (Gallie *et al.*) é preferida na presente invenção para dar um aumento nos níveis de expressão do tecido constitutivo específico e de promotores indutíveis tais como os da expressão do gene restaurador por exemplo barstar, é muito superior ao necessário para inibir o gene desregulador por exemplo barnase que é produzido. Gallie *et al.* demonstraram que a translação de mRNA procariótico e eucariótico é aumentado mais grandemente por um derivado contíguo do nucleótido 68, sequência lider 5' do vírus do mosaico do tabaco, estirpe U1 chamada Ω. Várias outras sequências lider virais são também conhecidas para aumentar a expressão, tal como vírus do mosaico da luzerna (A1MV) e vírus do mosaico em vassoura (BMV). Em protoplastos do mesófilo de tabaco foi observado um aumento de 20 vezes. Outras sequências potenciadoras por exemplo de vírus dos arabescos do tabaco podem também ser usadas na presente invenção.

Adicionalmente, o uso de sequências de intrão para aumentar os níveis de expressão está bem documentado. Entre as estudadas estão a sequência 1 de intrão adh 1 do milho as quais mostraram aumentar os níveis de expressão 12-20 vezes quando inseridas nas sequências traduzidas 5' em construções quiméricas introduzidas em protoplastos de milho (Mascarenhas *et al.* 1990) e o intrão Sh 1 também do milho. A inclusão deste intrão nas construções nas quais o promotor CaMV35S dirigia a expressão CAT que resultou no aumento de entre 11 e 90 vezes. (Vasil et al 1989).

Os níveis de expressão do restaurador e dos genes desreguladores podem também ser balanceados ou modulados nas seguintes vias. Um promotor que dê altos níveis de expressão pode ser usado para conduzir a expressão do gene restaurador enquanto que um promotor que dê baixos níveis

de expressão pode ser usado para conduzir a expressão do gene desregulador. Isto pode assegurar que o produto de gene desregulador é sobrecarregado com produto de gene restaurador inativando assim todas as moléculas desreguladoras ou citotóxicas ou permitindo total restabelecimento da fertilidade. Um outra via de modulação dos níveis de expressão podem ser realizadas usando mutagénese para alterar a sequência em torno do codão de iniciação AUG no qual uma via para expressão do gene desregulador é não otimizada (Kozak (1989)) e é portanto regulada para baixo.

Os sistemas de expressão podem ser introduzidos numa planta ou célula vegetal através de quaisquer dos métodos disponíveis tais como transformação de *Agrobacterium*, eletroporação, microinjeção de protoplastos e células vegetais, bombardeamento com microprojétil, bombardeamento bacteriano, particularmente o método de "fibra" ou "whisker", dependendo das espécies vegetais particulares a serem transformadas. As células transformadas podem então em casos adequados ser regeneradas em plantas completas nas quais o novo material nuclear é incorporado estavelmente no genoma. Tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas transformadas podem ser obtidas deste modo. Pode fazer-se referência à literatura para pormenores completos sobre os métodos conhecidos.

Christou e Heie (1997) descrevem a transformação de arroz usando metodologia de bombardeamento e progressos na transformação de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Outros métodos publicados para transformação de trigo incluem Becker *et al* (1994) os quais descrevem o uso de

bombardeamento de microprojétil de tecido escutelar e Vasil *et al* (1993) os quais descrevem a rápida geração de trigo transgénico a seguir ao bombardeamento direto de embriões imaturos. A Figura 22 descreve prazos para transformação de trigo por bombardeamento.

O uso de um marcador seleccionável é necessário no processo de transformação para selecionar transformantes que transportam as construções de esterilidade. Estes podem ser um antibiótico marcador selecionável ou um gene de resistência a herbicida. O uso de um gene de resistência a herbicida ou outro marcador não é essencial (mas pode ser considerado ser conveniente) para o processo de produção de semente híbrida. As plantas hemizigóticas usadas no método da presente invenção podem ser tratadas com químicos para induzir a expressão dos genes restauradores o que permite que a autopolinização ocorra. A descendência desta autopolinização será de segregação e pode ser crescida, tratada com químicos e ser autopolinizada. A descendência das linhas homozigóticas não será segregada para a esterilidade. Uma repetição do processo pode então ser realizada para aumentar a massa de semente estéril homozigótica.

Os componentes individuais das cassetes de expressão da presente invenção podem ser fornecidos num ou mais vetores individuais. Estes podem ser usados para transformar ou co-transformar células vegetais de modo a permitir que ocorra a interação apropriada entre os elementos.

A presente divulgação vai agora ser descrita através dos exemplos nos quais deve ser feita referência às Figuras acompanhantes nas quais:

A Figura 1 mostra uma representação esquemática de cassetes de expressão usadas num método de produção de semente híbrida usando progenitor feminino estéril masculino homozigótico recessivo.

As Figuras 2a e 2b mostram a geração de semente híbrida F1 de um progenitor feminino estéril, masculino homozigótico recessivo, e um progenitor masculino, feminino estéril, e a segregação na geração F2.

A Figura 3 mostra uma representação esquemática de cassetes de expressão usadas no processo de produção de semente híbrida.

A Figura 4 mostra uma representação esquemática de uma cassete de expressão usada na produção de uma planta progenitora feminina fértil estéril masculina usando o promotor específico da flor masculina e um tecido promotor específico feminino.

A Figura 5 mostra uma representação esquemática de uma cassete de expressão usada na produção de uma planta progenitora masculina estéril feminina usando um promotor específico da flor masculina e um promotor específico da flor feminina.

As Figuras 6a, 6b e 6c mostram a geração das plantas híbridas F1 usando uma planta progenitora feminina, masculina estéril, e uma planta progenitora masculina, feminina estéril, ambas sob o controlo de promotores esporofíticos, a geração da semente híbrida F1 e a segregação da descendência F2.

As Figuras 7a, 7b e 7c mostram a geração de plantas híbridas F1 usando uma planta progenitora feminina masculina estéril e uma planta progenitora masculina feminina estéril, estando a esterilidade masculina sob o controlo de um promotor gametofítico e a esterilidade feminina estando sob o controlo de um promotor esporofítico, a geração da semente híbrida F1 e a segregação da descendência F2.

A Figura 8 mostra o vetor binário pMOG1006 de transformação de plantas.
A Figura 9 mostra o vetor binário pMOG1006-FSE de transformação de plantas.
A Figura 10 mostra o vetor de clonagem pFSE4.
A Figura 11 mostra a expressão GST em vários tecidos de milho por análise de northern.
A Figura 12 mostra a expressão indutível do gene repórter GUS em folha de tabaco pelo promotor GST.
A Figura 13 mostra a expressão indutível do gene repórter GUS em folha de milho pelo promotor GST.
A Figura 14 mostra a expressão indutível do gene repórter GUS em pendões de milho pelo promotor GST.
A Figura 15 mostra a expressão indutível do gene repórter GUS no endosperma de milho.
A Figura 16 mostra as estratégias de clonagem de pPUG e RMS-3.
A Figura 17 mostra o vetor pGSTTAK.
A Figura 18 mostra o vetor RMS-3.
A Figura 19 mostra o mapa de pSRN.AGS, um vetor de expressão de GUS indutível para uso em espécies dicotiledóneas.
A Figura 20 mostra a estratégia de clonagem para pSRN.AGS, um vetor de expressão de GUS indutível para uso em espécies dicotiledóneas.
A Figura 21 mostra o mapa de pUIRN.AGS, um vetor de expressão de GUS indutível para uso em espécies monocotiledóneas.
A Figura 22 mostra prazos para transformação de trigo por bombardeamento.
A Figura 23 mostra o mapa de pSRN.
A Figura 24 mostra o mapa de pAGS.
A Figura 25 mostra o mapa de pMOG1006-SRN.AGS, um vetor de transformação de arroz.
A Figura 26 mostra o mapa de pGUN.

A Figura 27 mostra o mapa de pdvh405.
A Figura 28 mostra Tap1AlcR-AlcAGluGUSIntnos.
A Figura 29 mostra Stig1AlcR-AlcAGluGUSIntnos.
A Figura 30 mostra um vetor de transformação de milho Zm/RMS14.
A Figura 31 mostra pMOG1006-C5-GUS, um vetor de transformação de arroz.
A Figura 32 mostra vetor de clonagem pFSE.
A Figura 33 mostra pMOG1006-MFS14-GUS, um vetor de transformação arroz.
A Figura 34 mostra a Cassete A, MFS14-barnase/barstar-nos.
A Figura 35 mostra a Cassete B, C5-barnase/barstar-nos.
A Figura 36 mostra a Cassete C, CaMV 35S-AlcR-nos.
A Figura 37 mostra a Cassete D, AlcA.Glul11-barstar-nos.
A Figura 38 mostra a Cassete E, MFS14.Glu11-barstar-nos.
A Figura 39 mostra a Cassete F, Stig1-barnase/barstar-nos.
A Figura 40 mostra a Cassete G, Stig1.Glu11-barstar-nos.
A Figura 41 mostra RMS30.
A Figura 42 mostra RMS32.
A Figura 43 mostra a expressão de GUS em *callus* de tabaco do tipo selvagem e transgénico Alc-GUS não induzido e induzido com etanol.
A Figura 44 mostra a expressão de GUS em anteras de tabaco do tipo selvagem e transgénico Alc-GUS não induzido e induzido com vapor de etanol.
A Figura 45 como acima mas induzido por imersão das raízes em água e etanol.
A Figura 46 mostra a expressão de GUS em pistilos não induzidos e induzidos a partir de gomos florais de tabaco com 9-10mm.

A Figura 47 mostra a expressão de GUS em pistilos não induzidos e induzidos a partir de gomos florais de tabaco com 17-22mm.

A Figura 48 mostra a expressão de GUS em pistilos não induzidos e induzidos a partir de gomos florais de tabaco com 33-35mm.

A Figura 49 mostra a expressão de GUS em flores de colza oleaginosa não induzidas e induzidas.

A Figura 50 mostra flor de colza oleaginosa não induzida.

A Figura 51 mostra a expressão de GUS em pistilos de colza oleaginosa dois dias após a indução por imersão.

As Figuras 52 até 55 mostram a expressão de GUS em estigmas e estiletes de colza oleaginosa induzidos em etanol.

A Figura 56 mostra pistilos Alc-GUS de colza oleaginosa do tipo selvagem e induzidos em água.

A Figura 57 mostra pistilos Alc-GUS de colza oleaginosa dois dias após imersão das raízes em etanol a 2%.

A Figura 58 mostra pistilos Alc-GUS tratados com água e etanol a 5%.

A Figura 59 mostra flor de colza oleaginosa após indução.

A Figura 60a mostra a expressão de GUS em anteras de tomate, conduzida pelo promotor Alc A e a 60b mostra a expressão de GUS em pólen de tomate, conduzida pelo promotor Alc A.

A Figura 61 mostra a sequência de DNA que codifica a sequência promotora ZmC5 em milho.

O A sublinhado é o ponto de partida putativo transcricional e o ATG a negrito e sublinhado é o ponto de partida putativo transcricional.

EXEMPLO 1

Neste exemplo, a planta progenitora masculina é masculina fértil e feminina estéril homozigótica como resultado de uma mutação natural ou manipulada. A planta progenitora feminina é masculina estéril homozigótica recessiva e feminina fértil. A esterilidade masculina pode ser geneticamente manipulada ou introduzida por cruzamento ou ser devida a uma mutação natural. Por exemplo, pode ser devida a uma mutação num gene tal como MS45 que demonstrou agir num modo recessivo, conduzindo somente a esterilidade quando homozigótica.

As linhas progenitoras contêm também uma sequência de DNA que codifica um promotor indutível operativamente ligado a uma cópia funcional do gene da esterilidade restabelecendo assim a fertilidade para fins de manutenção de linhas progenitoras femininas e masculinas, respetivamente (ver Figura 1).

Cruzando estas duas plantas progenitoras geram híbridos F1 os quais são heterozigóticos para a esterilidade masculina recessiva e alelos de esterilidade feminina e são portanto completamente férteis. Se, porém, o agricultor recolher e semear a semente F1, a geração F2 segrega a esterilidade que conduz a uma perda de heterose e aproximadamente 25% de plantas femininas produzidas são estéreis (ver Figuras 2a, 2b e 2c).

Embora as mutações recessivas femininas sejam conhecidas em milho, os genes ainda não foram clonados.

EXEMPLO 2

Um segundo método de produção de semente híbrida foi formulado com base na esterilidade provocada pela manipulação genética (ver Figura 3).

PROGENITOR FEMININO

O progenitor feminino é uma linha masculina estéril i.e. um gene de inativação que é expresso por um promotor esporofítico masculino evitando assim a produção de pólen viável funcional. Adicionalmente, um gene restaurador é expresso nos tecidos femininos. A autofertilidade pode ser restabelecida por meio de um promotor indutível ligado a um gene restaurador. A transformação co m uma tal cassete de expressão (ver Figura 4) conduzindo a plantas hemizigóticas MS RF RCS -----.

R^{CS} = fertilidade masculina e feminina restaurável quimicamente
MS = esterilidade masculina dominante
R^{M} = fertilidade masculina restauradora dominante
FS = esterilidade feminina dominante
R^{F} = restaurador de fertilidade feminina dominante

Para obter plantas homozigóticas para uso na produção de semente híbrida, as plantas hemizigóticas têm de ser induzidas com um indutor químico exógeno, tal como etanol no caso do comutação de gene Alc A/R, e deixadas autopolinizar-se.

Gâmetas	MS $R^{F}R^{CS}$	--------
MS $R^{F}R^{CS}$	MS $R^{F}R^{CS}$	--------
	MS $R^{F}R^{CS}$	MS $R^{F}R^{CS}$
--------	--------	--------
	MS $R^{F}R^{CS}$	--------

Três quartos das plantas produzem 100% de pólen estéril como gene de esterilidade tem um efeito dominante, somente a linha nula é masculina fértil. A planta homozigótica pode

ser distinguida das plantas heterozigóticas através da sementeira das sementes resultantes da autopolinização para repetir o procedimento de indução e autopolinização. A descendência destas segrega a esterilidade e podem facilmente ser avaliadas, dependendo do genótipo, como descrito anteriormente. Resistência a herbicida ou outro gene marcador selecionável pode também ser usado para avaliação. Neste caso da planta homozigótica toda a descendência será masculina estéril (e resistente a herbicida,) no caso da heterozigótica, a descendência irá continuar a segregar quanto à esterilidade.

Assim, a linha homozigótica feminina fértil, homozigótica masculina estéril, pode ser selecionada deste modo.

PROGENITOR MASCULINO

A planta progenitora masculina é completamente masculina fértil mas é feminina estéril i.e. homozigótica feminina estéril, masculina fértil. Neste caso, a esterilidade feminina é conseguida através da expressão, nos órgãos florais femininos, um gene inibidor o qual é prejudicial para o desenvolvimento do órgão floral feminino como definido anteriormente. Alternativamente, o tubo polínico pode ser destruído ou as plantas podem de outro modo ser impedidas de desenvolver semente. Um gene restaurador é também expresso nos tecidos florais masculinos.

A planta progenitora masculina é obtida do mesmo modo que a planta progenitora feminina mas usando a construção mostrada na Figura 5. Neste caso, as plantas hemizigóticas têm o genótipo:-

FS $R^{M}R^{CS}$ .....

E as plantas homozigóticas terão o genótipo

FS FS R^M R^M R^{CS} R^{CS}

EXEMPLO 3

Neste exemplo, a cassete de expressão compreende um promotor gametofítico (por exemplo específico de pólen) (ver Figura 5). A planta progenitora masculina é como descrito no Exemplo 2 acima. Exemplos de promotores específicos de pólen incluem Zm13 (Hanson *et al.*) e C5, depositado na The National Collection of Industrial e Marine Bacteria como NCIMB 40915 em 26 Janeiro de 1998. A sequência promotora C5 é mostrada na Figura 61. Uma vez mais a linha homozigótica masculina estéril deve ser obtida e as plantas hemizigóticas são tratadas quimicamente e autopolinizadas.

Gâmetas	MS R^F R^{CS}	--------
MS R^F R^{CS}	MS R^F R^{CS}	MS R^F R^{CS}
	MS R^F R^{CS}	--------
--------	MS R^F R^{CS}	--------
	--------	--------

Neste caso, a linha homozigótica i.e. MS MS R^F R^F R^{CS} R^{CS} produz 100% de pólen estéril o qual pode ser identificado por coloração DAPI. Este pode ser distinguido do pólen da planta heterozigótica a qual produz pólen 50% estéril e 50% fértil o qual é também identificável por coloração DAPI.

Assim, a linha MS MS R^F R^F R^{CS} R^{CS} pode ser selecionada.

Pode portanto ver-se que nenhum dos progenitores masculino ou feminino homozigótico pode autopolinizar-se.

A planta progenitora feminina no Exemplos 2 e 3 carrega uma cassete de expressão compreendendo um promotor específico feminino que conduz a expressão de um gene restaurador, e a planta progenitora masculina carrega uma expressão de cassetes compreendendo um promotor específico masculino conduzindo a expressão de um gene restaurador. Nas plantas progenitoras, estas cassetes de expressão não têm efeito na fertilidade devido à especificidade dos promotores.

Porém, quando estas duas linhas progenitoras são cruzadas, o resultado depende de se foi usado um promotor gametofítico (por exemplo específico de pólen) ou um esporofítico (por exemplo específico de tapete) para produzir a esterilidade masculina no progenitor feminino. Quando um promotor esporofítico é usado é obtido o restabelecimento total da fertilidade e a semente F1 é totalmente fértil i.e. produz aproximadamente 100% de pólen fértil (ver Figuras 6a, 6b). Se, porém, a semente F1 é retida e crescida pelo agricultor, a esterilidade segrega como acima (ver Figura 6c). Se um promotor gametofítico é usado para obter esterilidade masculina, o restabelecimento total da fertilidade não é alcançado dado que o pólen é haplóide e somente cerca de 50% de pólen vai herdar o alelo funcional produzindo pólen com fertilidade (ver Figuras 7a, 7b). A descendência F2 segrega como descrito previamente (Figura 7c).

A manutenção das linhas homozigóticas estéreis é alcançada, quando necessário, pelo terceiro componente do sistema. Cada linha parental compreende, portanto, um promotor indutível, opcionalmente ligado a uma sequência potenciadora ou uma ou mais sequências de intrão, conduzindo a expressão do restaurador em todos os tecidos na aplicação da indução química, permitindo assim a produção de pólen no progenitor feminino e o

desenvolvimento de óvulos e tecidos normais no progenitor masculino. A autopolinização pode então ocorrer permitindo aumentar a quantidade da semente parental.

Em todos os Exemplos, a aplicação de químicos no campo é necessária somente para produzir semente se as linhas progenitoras necessitarem de ser feitas com pouca frequência e numa área de plantação relativamente pequena.

Nos Exemplos descritos, é possível usar um promotor específico de tapete (Figuras 6a, 6b ou 6c) ou de pólen (Figuras 7a, 7b) para conduzir a expressão de inativação de genes. O uso de um promotor específico de tapete é preferido dado que a fertilidade pode ser completamente restabelecida. Porém, como o pólen é haplóide, a recuperação total da fertilidade não é possível quando é usado um promotor específico de pólen. Pode porém, ser vantajoso usar um promotor específico de pólen. Por exemplo, promotores específicos de pólen podem ter maior especificidade de tecidos. O tratamento químico das plantas só é necessário para restabelecer a fertilidade para permitir autopolinização.

EXEMPLO 4

PREPARAÇÃO DE VETORES GERAIS DE CLONAGEM

Todas as técnicas de biologia molecular foram realizadas ou como descrito por Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edição (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press: Vols I e II (D.N. Glover ed 1985) ou como recomendado pelos fabricantes nomeados.

Preparação de pMOG1006-Fse

O pMOG1006 (Figura 8) é um vetor binário o qual carrega um gene de resistência a higromicina como marcador

selecionável e é usado para transformação de arroz mediada por Agrobacterium. O vetor modificado foi preparado digerindo o pMOG1006 com EcoRI e inserindo um par emparelhados de oligonucleótido complementares com as sequências

Link1A AAT TGA TCG GCC GGC CCT AG
Link1B AAT TCT AGG GCC GGC CGA TC

que introduzem um único sítio *Fse*I. Clones contendo a sequência de oligonucleótidos correta foram selecionados por hibridação com oligonucleótido link1A marcado com γ32P e clones contendo a sequência na orientação desejada selecionado após caracterização por sequenciação (Figura 9).

pVB6

pVB6 é análogo do vetor binário descrito acima na medida em que contém o único sítio Fse1 mas carrega o marcador npt11 selecionável e é usado na transformação de tabaco mediada por *Agrobacterium*.

Preparação de pFse4 (Figura 10)

Este vetor foi construído para permitir a montagem de vetores contendo várias cassetes de expressão. Isto foi atingido usando reconhecimento de sítios de restrição de enzima de 8-base raras na região de múltiplo sítio de clonagem. O DNA pFSE (Fig 32) foi digerido com FseI e a existente região de múltipla clonagem removida. Oligonucleótidos complementares com as sequências:-

DAA-1A:

5' CCGTTTAAACATTTAAATGGCGCGCCAAGCTTGCGGCCGCC GGGAATTCGGCCGG-3'

DAA-1S:

5' CCGAATTCCCGGCGGCCGCAAGCTTGGCGCGCCATTTAAATGT TTAAACGGCCGG-3'

foram inseridos. Esta sequência introduz um único EcoRI, NotI, *Hind*III, AscI, SwaI e um sítio flanqueado PmeI por sítios FseI. As cassetes de expressão foram agrupados em pSK+ e ligandos inseridos para flanquear cada cassete com sítios únicos como descrito abaixo. As cassetes completas foram depois inseridas no pFSE4 como requerido. As cassetes múltiplas podem então ser removidas como um fragmento FseI dos vetores pMOG1006-Fse1 e VB6 descritos acima.

EXEMPLO 5

CLONAGEM DE PCR DO PROMOTOR STIG1 DE TABACO

Um fragmento de 1,6 kb foi amplificado por PCR a partir de 100ng de DNA genómico de tabaco usando DNA polimerase *Pfu Turbo* da Stratagene e oligonucleótidos ST1-L2 (5'-ATTCGACCTCGCCCCCGAGCTGTATATG-3') e ST1-R2 (5'-GATGAGAATGAGAAGGTTGATAAAAGCC-3'). As condições de termociclagem foram como a seguir:-

95°C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 4 minutos, seguido por uma incubação final a 72°C durante 5 minutos. Um produto de amplificação de 1,6kb foi purificado em gel usando Kit Extração Gel QIAquick da QIAGEN e ligado no vetor pCR-ZERO Blunt da Invitrogen. A sequência de DNA da inserção foi determinada, e exibia 100% de identidade com a sequência STIG1

publicada (Goldman *et al* 1994). A inserção foi depois transferida, num fragmento SacI-NotI, no pBluescript SK+ para manipulação adicional (pSK-STIG1).

EXEMPLO 6

PREPARAÇÃO VETORES DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS PARA TESTAR A EXPRESSÃO DE PROMOTORES INDUTÍVEIS QUIMICAMENTE

GST-GUS

A caracterização do milho GST27 cDNA foi previamente relatada e as experiências mostraram que GST 27 não é constitutivamente expresso nas barbas, folhas, embriões ou endosperma. Após a aplicação de um protetor, a expressão foi detetado em todos esses tecidos (ver Figuras 11 até 15). Transformação de plantas construções utilizando o promotor GST 27 para conduzir a expressão de GUS pode ser feito como descrito na Patente US No 5,589,614 (Figura 16). Estes são pGSTTAK (Figura 17) para transformação de tabaco e RMS-3 (Figura 18) para transformação de milho. Estes vetores podem ser usados para gerar tabaco estável e transformantes de milho. Fitoprotetores formulados podem ser aplicados tanto como uma pintura da folha (tabaco) ou como uma banho da raiz (milho) como descrito na patente supracitada e expressão de GUS observada. Os resultados para a indução de expressão de GUS em folhas de tabaco são mostradas na Figura 12; clara indução da expressão tem ocorrido até 100X. Similarmente, para milho houve uma indução da expressão de GUS em folhas após tratamento com o fitoprotetor. A indução da expressão foi também observada em pendões e tecido endospérmico e embrião.

Foi também RMS-3 para transformar trigo, e a indução da expressão de GUS foi estudada. Vetores modificados usando

higromicina como marcador selecionável pode ser introduzido em arroz.

GST-Barstar

O vetor de transformação de milho Zm/RMS 14 (descrito acima) carrega um gene barstar ligado com promotor GST-27 induzido por fitoprotetor. WU25 mostrou por PCR conter este gene de fusão. A reversão da esterilidade foi demonstrada através da aplicação por imersão da raiz no fitoprotetor R-29148 para estufas de crescimento de plantas. As plantas tratadas mostraram aumento do tamanho da bandeira em relação às plantas não tratadas. Não há efeitos do fitoprotetor no tamanho ou fertilidade das bandeiras ou das plantas férteis não transgénicas. Foi observada correlação com o aumento do tamanho da bandeira, no desenvolvimento do micrósporo nas amostras de anteras tomadas a partir de amostras com banho das raízes na estufa. Um efeito similar foi visto após uma aplicação foliar às plantas cultivadas no campo, mas não nas plantas não tratadas em qualquer experiência. A retoma do desenvolvimento do micrósporo aparece ligado à inibição de barstar e inibição de barnase ultrapassando assim a ablação das células do tapete. Em plantas expostas para o tratamento prolongado com fitoprotetor, a microsporogénese tinha procedido resultando em anteras preenchidas com pólen pós-mitótico imaturo. Em contraste, as anteras das plantas estéreis colapsaram.

pSRNAGS

Um vetor binário de transformação de plantas, pSRNAGS (Figura 19) foi construído de acordo com a estratégia descrita na Figura 20. Este vetor compreende o promotor quimérico 35S-Alc A dirigindo a expressão de GUS e o 35S promotor CaMV conduzindo a e expressão do gene Alc R.

pUIRN.AGS

Um vetor de base pUC para uso na transformação de milho e trigo foi preparado no qual o promotor ubiquitina ligado ao intrão ubiquitina foi usado para conduzir a expressão do gene AlcR (Figura 21). Os tempos para obter trigo transgénico são mostrados na Figura 22.

pMOG1006-SRNAGS (Arroz)

O pSRN de plasmídio (Figura 23) foi digerido com EcoRI e *Hind*III para libertar um fragmento de 2,6 kb(AlcR-nos) o qual foi clonado como um fragmento EcoRI-*Hind*I em pMOG1006. O fragmento promotor 560 bp CaMV 35S foi depois clonado no sítio *EcoR*I para produzir 35S-AlcR-nos, os clones na orientação desejada foram selecionados por análise de sequência (pSRN). O pAGS plasmidio (Figura 24) foram digeridos com *HindIII* e um fragmento de 2,5 kb (AlcA-GUS-nos) foi clonado no sítio *Hind*III de pMOG1006-SRN para produzir a construção final chamada pMOG1006-SRN-AGS (Figura 25). A orientação do fragmento *Hind*III foi determinada por restrição e análise de sequência.

Com vista a otimizar os níveis de expressão de AlcR no tapete, pistilo, pólen e outros tecidos reprodutivos os vetores seguintes foram preparados usando promotores específicos de tecidos para conduzir a expressão AlcR.

AlcA-Glu11-GUSint-nos

Um sítio SacI no final do gene GUS no pGUN (Fig 26) como é alterado para um sítio PstI usando o kit QUIckChange como usual e uma subsequente digestão NcoI-SacI contendo o gene GUS (+ intrão) foi usado para substituir o gene barstar na cassete D (ver à frente) para produzir um vetor contendo GUS-nos melhorador de glucanase promotora de AlcA. Isto foi excisado como um fragmento PmeI e clonado no pFSE4.

Tap1-AlcR-nos-AlcA-Glu11-GUSint-nos

O AlcA-Glu11-GUSint-nos (Glu11 é a região glucanase 5' não traduzida) foi clonado como um fragmento PmeI no PmeI corte pFSE4.

O promotor Tap 1 específico de tapete originalmente isolado de Antirrhinum e agora clonado a partir de pvdh405 (Figura 27) foi clonado como um fragmento EcoR1 em pSK-AlcR-nos (gerado pela clonagem do fragmento EcoRI-*Hind*III do pSRN em pSK+) e o Tap1-AlcR-nos resultante foi clonado como um fragmento NotI em pFSE4-AlcA-Glu11-GUSint-nos. O inserido FseI resultante foi inserido no pVB6 para gerar o vetor de transformação final de tabaco (Figura 28).

Stig1-AlcR-nos-AlcA-Glu11-GUsint-nos

Esta construção foi feita como acima exceto que o promotor Stig1de transmissor especifico de trato do pistilo clonado do tabaco (ver a seguir) foi clonado como um fragmento EcoRI-NcoI no pSK-AlcR-nos, e com outras manipulações como realizado acima. (Figura 29).

EXEMPLO 7

CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA AVALIAR ESPECIFICIDADE DE TECIDOS PROMOTORES MASCULINOS

pMS14-GUS

O fragmento promotor de 5,8 Kb de MFS14 (Wright *et al.* 1993) foi ligado ao gene repórter GUS. A expressão de GUS foi detetada somente em anteras nos estádios precoces do desenvolvimento do gomo floral mas não nas folhas.

pMS14- Barnase

O mesmo fragmento promotor foi ligado a barnase para gerar o vetor transformação ZM/RMS14 de milho (Figura 30). Esta

fusão também continha um gene barstar fora do quadro com um promotor bacteriano funcional para dar proteção contra barnase durante os passos de clonagem. Plantas de milho transgénico foram obtidas e várias progrediram para análise adicional. Uma planta WU25 em particular foi estudada com algum pormenor analisando a descendência derivada de cruzamentos com pólen de uma planta totalmente fértil. Toda a descendência que herdou o transgene como avaliado por PCR e folhas pintadas para detetar o gene pat eram completamente estéreis, enquanto que a descendência sem o transgene era totalmente fértel. As bandeiras estéreis eram geralmente menores que aquelas dos parentes férteis e carregavam anteras sem pólen que não usam a bandeira. Em todos os outros aspetos as plantas estéreis não se distinguiam dos seus irmãos fértil não transgénicos.

pC5-GUS

Um clone genómico de pectina metil esterase de milho (chamado C5 como mostrado na Figura 61) foi isolado e o promotor usado nas fusões transcricionais com GUS para permitir o estudo da especificidade de tecidos. Este vetor foi introduzido em tabaco por transformação em Agrobacterium e os transformantes selecionados em canamicina. Os grãos de pólen das anteras deiscentes foram colhidos e corados quanto à atividade GUS. Duas plantas mostraram aproximadamente 50% de pólen com coloração azul. Foi observada a ausência de coloração nos controlos não transgénicos. Foram feitos extratos a partir de vários dos tecidos incluindo estádios de anteras em desenvolvimento e analisados fluorometricamente para a expressão de GUS. Somente muito baixos níveis de expressão foram vistos nos tecidos que não das anteras em desenvolvimento e deiscentes. A coloração do micrósporo indica que o momento da expressão está de acordo com os dados de Northern o que mostra que ambos no tabaco e o milho transgénicos, o seu

ambiente nativo o promotor ZmC5 funciona no desenvolvimento do pólen.

pMOG1006-C5-GUS (Arroz)

C5-GUS(bin) foi cortado com EcoRI e *BamH*I para produzir um fragmento *BamH*I-EcoRI de 2,1 kb (GUS-nos) o qual foi clonado em EcoRI-*BamH*I corte pMOG1006 e um fragmento *BamH*I de 1,9 kb (promotor C5) o qual foi subsequentemente clonado neste pMQG1006-Gusnos para produzir o vetor final, pMOG1006-C5-GUS, orientação do promotor foi confirmado por sequenciação (Figura 31).

pMOG1006-MFS14-GUS (Arroz)

O promotor MFS 14 de 2,3Kb foi isolado a partir de vetor RMS30 (Figura 41) usando *BamH*I e clonado em pFSE (Figura 32). As cassetes intrão GUS foram depois clonadas a partir de pGUN como um fragmento *Pst*I no vetor pFSE-MFS14. O fragmento completo MFS14-GUSint-nos foi depois clonado como um fragmento FseI em pMOG1006-Fse (Figura 33).

EXEMPLO 8

PREPARAÇÃO DE VETORES PARA GERAR E RESTABELECER ESTERILIDADE

FERTILIDADE

Preparação da Cassete A-MFS14-barnase-nos -uma cassete esterilidade masculina esporofítica dominante.

O terminador nos de RMS 14 foi isolado como um fragmento EcoRI-*Hind*III e clonado em pSK+ corte com as mesmas duas enzimas. Um plasmídeo resultante foi digerido com *Hind*III e um par emparelhados de oligonucleótido complementar com as sequências:-

Link2A AGCTTC TGG AAT TCG TCT
Link2B AGC TAG ACG AAT TCC AGA

i.e. codificando Δ*Hind*III-EcoRI-*Hind*III ligado com o vetor de corte. Colónias transformadas putativas foram alinhadas em membranas de nylon e sondadas da maneira usual com o oligonucleótido Link2A marcado com γ^{32P}. Algumas colónias positivas foram analisadas por sequenciação e um clone com a orientação na qual o sítio e *Hind*III foi interna relativa para os dois sítios EcoRI selecionados para manipulação adicional. Neste vetor, cortado com *Hind*III e tratado com fosfatase alcalina de camarão para evitar a religação do vetor foi ligado um fragmento *Hind*III isolado de RMS 14 carregando o promotor MFS 14 e os barnase e barstar que codifica sequências. Transformantes contendo o fragmento *Hind*III na desejada orientação foram identificados pela análise de sequência (Figura 34). O fragmento completo carregando MFS14-barnase/barstar-nos foi excisado do fragmento EcoRI e inserido no pVB6 e pMOG1006-Fse via pFse4 para introdução em arroz e tabaco.

Preparação da Cassete B-C5-bamase- uma cassete de esterilidade masculina gametofítica dominante.

O único sítio *Sal*I de pBluescipt SK+ (Stratagene) foi substituído por um sítio de reconhecimento NotI por inserção de um ligante oligonucleótido MKLINK4 (5'-TCGATTCGGCGGCCGCCGAA-3') no sítio digerido SalI site. Um fragmento, *BamH*I-*Hind*III, 0,9kb, carregando a região de codificação de barnase seguido por um barstar bacteriano-promotor-dirigido que codifica a região, foi inserido no fragmento correspondente do pBluescript modificado. O terminador *nos* num fragmento *Hind*III-*Not*I foi inserido no fragmento correspondente de um vetor resultante. Um sítio

*BamH*I não desejado foi depois removido usando sistema QuickChange da Stratagene, seguindo as instruções de fabricante e usando oligonucleótidos DAM-3A (5'-GGTCGACTCTAGAGGAACCCCGGGTACCAAGC-3') e DAM-3S (5'-GCTTGGTACCCGGGGTTCCTCTAGAGTCGACC-3'). Um plasmídeo resultante (chamado pSK-BBN) foi digerido para completar com *BamH*I, desfosforilado com fosfatase alcalina de camarão (37°C, 1 hora). Um fragmento *BamH*I de 1,9kb da região C5 5' de flanqueamento foi ligado a este, seguido por digestão com *BamH*I e *Pst*I para verificar se há a presença e orientação da inserção, respetivamente. Um plasmídeo resultante foi chamado pSK-C5-BBN (Figura 35). A cassete completa foi depois removida como um fragmento EcoR1- Not1 a um vetor binário pVB6 de transformação de plantas. A construção foi então introduzida em *Agrobacterium Tumefaciens* pelo método congelamento-descongelamento. Técnicas padrão foram usadas para introduzir o DNA em tabaco.

Preparação da Cassete C -35S-AlcR-nos

Um fragmento *EcoR*I-*Hind*III foi isolado a partir do vetor conhecido como pUC3, este fragmento contém a sequência que codifica AlcR e terminador nos. Este fragmento foi clonado no EcoRI-*Hind*III de corte pSK+. Um par emparelhados de oligonucleótidos complementares com a sequências:-

Link5A AGC TAT TAG CGG CCG CTA TGT TTA AAC GCG T
Link5B AGC TAC GCG TTT AAA CAT AGC GGC CGC TAA T

carregando sítios de restrição para Δ*Hind*III-NotI-PmeI-Δ*Hind*III foi inserido no sítio *Hind*III, adicionando assim um sítio Pme1 e Not1 e excluindo o sítio *Hind*III na terminação 3' da cassete. O fragmento EcoRI de pUC3 carregando o promotor 35S CaMV foi clonado no sítio EcoRI e

orientado por restrição e análise de sequência (Figura 36). A cassete completa pode ser excisada como um fragmento NotI para manipulação adicional, e contém o sítio *Pme*I no qual a cassete AlcA-Glu11-barstar-nos pode ser inserida.

Reparação da Cassete D AlcA-Glu11-barstar-nos

O vetor pMJB1 foi digerido com *Xho*I e NcoI para remover o potenciador TMV ómega. Dois oligonucleótidos que codificam a glucanase 11 5'UTR e flanqueada por *Xho*I e sítios *Nco*I, com as sequências:-

Glu1 TCG AGA CAA TTT CAG CTC AAG TGT TTC TTA CTC TCT CAT TTC CAT TTT AGC

Glu11 CAT GGC TAA AAT GGT TTT GAG AGA GTA AGA AAC ACT TGA GCT GAA ATT GTC

foram emparelhados como usualmente e ligado no vetor corte. O vetor sequenciado foi digerido com *Hind*III e *Xho*I para remover o promotor 35S CaMV e o promotor AlcA ligado num fragmento *Hind*III-*Xho*I. Um fragmento que codifica barstar com NcoI e terminações *BamH*I foi obtido por PCR a partir de RMS9. Este foi então inserido no vetor corte acima com NcoI-*BamH*I para dar uma cassete completa carregando AlcA-Glu11-barstar-nos. Com vista a facilitar a manipulação da cassete um sítio PmeI foi adicionado em cada terminação através do uso de oligonucleótidos que codifica Δ*Hind*III-PmeI-*Hind*III e ΔEcoRI-PmeI-AEcoRI (Figura 37). Isto permite a inserção desta cassete na cassete 35S-AlcR-nos descrita acima permitindo que ambos os componentes de AlcA/R mudar para ser movido para o pFSE4 como um fragmento *Not*I.

Preparação da Cassete E MFS14-Glu11-barstar-nos – uma cassete recuperadora de fertilidade masculina

Um fragmento 320bp *BamH*I-SacI carregando a terminação 3' do promotor MFS 14 foi clonado num *BamH*I-SacI corte pSK+. O sítio *Hind*III foi removido usando o kit QuikChange da Qiagen seguindo procedimentos padrão. O oligonucleótidos usados para remover o sítio tinham as sequências:-

MKM1A CGG TAT CGA TAA GCT AGA TAT CGA ATT CCT G
MKM1S CAG GAA TTC GAT ATC TAG CTT ATC GAT ACC G

A deleção do sítio foi confirmada por análise de restrição e por sequenciação. Um novo sítio *Hind*III foi então introduzido perto do sítio *Sac*I por inserção de oligonucleótidos emparelhados que codificam sítios Δ*Sac*I-*Hind*III-*Sac*I.

SHSLINK1 CAT AAA GCT TAT ACA GCT
SHSLINK2 GTA TAA GCT TTA TGA GCT

A presença de novos sítios foi confirmada através de análise de restrição e da orientação correta do ligante definida por sequenciação. A orientação desejada deu um sítio *Hind*III para o exterior do sítio *Sac*I em relação ao sítio *BamH*I. O sítio *BamH*I foi depois removido e um novo sítio *Xho*I introduzido do mesmo modo usando um oligonucleótido que codifica Δ*BamH*I-*Xho*I-Δ*BamH*I. Este tem a sequência:-

Link6 GAT CGT ATC TCG AGA TAC

A ausência do sítio *BamH*I e a introdução do sítio *Xho*I foi confirmada do modo usual.

O RMS 14 foi digerido com *Hind*III e *Sac*I e o fragmento de 5,5Kb que codifica o resto do promotor MFS14 foi isolado.

Este fragmento foi depois inserido no vetor *Hind*III-*Sac*I corte A totalidade do promotor MFS14 foi depois então excisado como uma cassete *Hind*III-*Xho*I e inserido na Cassete D substituindo o promotor AlcA no estádio antes da adição dos ligandos às terminações. Para esta cassete foram usados ligandos introduzindo sítios SwaI em cada terminação (Figura 38).

Preparação da Cassete F Stig1-barnase-nos- uma cassete de esterilidade esporofítica feminina

Um sítio *BamH*I foi introduzido perto do sítio de início de translação do promotor STIG1 no vetor pSK-STIG1. Isto foi conseguido usando o Kit Stratagene QuickChange com oligonucleótidos:-

ST1-BA (5'-GATAAAAGCCATAATTGGATCCTGGTGGTTTCTGC-3') e
ST1-BS (5'-GCAGAAACCACCAGGATCCAATTATGGCTTTTATC-3').

O promotor STIG1 de 1,6kb foi então libertado num fragmento *BamH*I e clonado em pSK-BBN digerido com *BamH*I. A presença e a orientação correta do promotor foram determinadas por amplificação por PCR entre o vetor e as sequências promotoras. A cassete STIG1-BBN foi transferida, num fragmento *Not*I-EcoRI para o vetor pFSE4, o plasmídeo resultante chamado pFSE4-STIG1-BBN (Figura 39). A cassete inteira foi depois transferida como um fragmento FseI para VB6.

Preparação da Cassete G Stig1-Glu11-barstar-nos- uma cassete recuperadora da fertilidade feminina

A construção pAlcA-GluII-barstar-nos-pp foi modificada para substituir um sítio de restrição *Hind*III por um sítio

*Eco*RI. Isto foi conseguido usando o Kit Stratagene QuickChange e oligonucleótidos:-

DAM-6A (5'-CGGAACTATCCCGAATTCTGCACCGTTTAAACGC-3') e
DAM-6S (5'-GCGTTIAAACGGTGCAGAATTCGGGATAGTTCCG-3').

Um sítio *Xho*I foi introduzido perto do sítio de início de translação do promotor STIG1 no vetor pSK-STIG1. Isto foi conseguido usando Kit QuickChange da Stratagene com o oligonucleótidos:-

ST1-XA (5'-GATAA,AAGCCATAATTGGCTCGAGGTGGTTTCTGCTGAG-3')
ST1-XS (5'-CTCAGCAGAAACCACCTCGAGCCAATTATGGCTTTTATC-3').

O promotor STIG1 de 1,6kb foi então libertado num fragmento *Xho*I-*Eco*RI e clonado num fragmento maior produzido por digestão pAlcA-gluII-barstar-nos-pp com *Xho*I e *Eco*RI, substituindo o promotor AlcA com o promotor STIG1 (Fig 40). Toda a cassete foi excisada num fragmento PmeI e clonada no pVB6 e pMOG1006-Fse.

Preparação de um vetor comutável TPS AlcA-TPS-nos Tap1-AlcR-nos

A cassete Tap1-AlcR-nos foi descrita. O gene GUS no pAGS foi substituído por TPS e a nova cassete foi clonada como uma cassete *Hind*III no pFSE4. O Tap1-AlcR-nos descrito anteriormente foi como um fragmento *Not*I neste vetor pFSE4-AlcA-TPS-nos. O fragmento completo Fse1 foi excisado e clonado no pVB6. Este vetor pode agora ser usado para retransformar tabaco tornado estéril por transformação com uma construção carregando uma cassete de expressão Tap1-TPP-nos.

EXEMPLO 9

PREPARAÇÃO DE VETORES DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Qualquer combinação das cassetes acima pode ser feita no pFSE4 e transferência subsequente de um resultante fragmento Fse1 no pMOG1006-Fse ou no pVB6 permite a transformação em tabaco ou arroz.

As seguintes combinações de cassetes foram feitas como vetores de transformação de plantas,

A+C+D = planta estéril esporofítica masculina cuja fertilidade é restaurável através de indução química do gene restaurador

E = planta esporofítica restauradora da fertilidade masculina, a qual quando polinizado por cruzamento nas plantas acima restabelece a fertilidade na descendência

F+C+D = planta estéril esporofítica feminina cuja fertilidade é restaurável através de indução química do restaurador de gene

G = planta esporofítica restauradora da fertilidade feminina a qual quando polinizada por cruzamento pela planta acima produz descendência feminina fértil.

B+D = planta gametofítica masculina estéril cuja fertilidade pode ser restaurada através de indução química do gene restaurador.

A geração dos progenitores das plantas híbridas F1 como descrito aqui é obtida pelas seguintes vias:-

Progenitor masculino i.e. feminino estéril

Cassete F	Stig1-barnase	esterilidade feminina
Cassete E	MFS14-Glu11-barstar	restaurador masculino
Cassete C	35S-AlcR-nos	componente comutador
Cassete D	AlcA-Glu11-Barstar	""

Progenitor feminino i.e. masculino estéril

Cassete A	MFS14-barnase	esterilidade masculina
Cassete G	Stig1-Glu11-barstar	restauradora feminina
Cassete C	35S-AlcR-nos	componente comutador
Cassete D	AlcA-Glu11-barstar	""

EXEMPLO 10

CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA TESTAR NOVO GENE PIG

RMS30 e RMS32 (Tabaco)

O gene tubulina foi clonado como um fragmento HinfI de ptubulina e clonado no pFSE-MFS 14 gerado acima. O MFS 14-tubulina nos resultante foi clonado no pVB6 como um fragmento FSE para produzir RMS30 (Figura 41).

O promotor operador MFS 14 + lac foi excisado do RMS32 como um fragmento *BamH*I e clonado no pFSE. A seguir à inserção do gene tubulina, o fragmento MFS 14-lac-op-tubulina-nos FseI foi clonado no pVB6 para produzir RMS32 (Figura 42).

RMS30 e RMS32 (Arroz)

Os fragmentos FseI contendo promotor MFS14 (+/- lac op)-tubulina-nos foram clonados no pMOG1006-Fse para gerar vetores de transformação de plantas.

Otimização da trealose-fosfato fosfatase (TPP) e trealose-6-fosfato hidrolase (TreC) para uso na geração da esterilidade em *Zea Mays*

Versões de regiões de codificação TPP e TreC otimizadas para expressão em *Zea mays* (a qual tem uma preferência para G ou C em posições redundantes de cada codão) são sintetizadas por Operon Technologies Inc. Sequências de nucleótidos são derivadas a partir das suas sequências de aminoácidos usando codões presentes *in vivo* acima 1,0% e em frequências representativas da proporções que ocorrem

naturalmente (de acordo com o Genbank Codon Usage Database, Release 108). Também incluídos são sítios de enzimas de restrição perto dos sítios de início de translação incluindo *BamH*I e NcoI e, um sítio *Pst*I nas terminações 3' para facilitar a clonagem.

Construções para testar o uso de codões otimizados TPP e TreC *Zea Mays*

O sítio *BamH*I na terminação 5' do promotor MFS14 no vetor pFSE-MFS 14 é removido usando o sistema QuikChange Stratagene com os oligonucleótidos:-

DAM-7A: 5'-CGATGCTTTCGGAACCGGTACCGAATTCG-3'
DAM-7S: 5'-CGAATTCGGTACCGGTTCCGAAAGCATCG-3'

Os genes TPP e TreC sintéticos são então excisados nos fragmentos *BamH*I - *Pst*I e clonados entre o promotor MFS14 e terminador nos no vetor pFSE-MFS14 modificado. O intrão adh1 é inserido entre o promotor e sequências codificando o aumento dos níveis de expressão. A cassete completa é então transferida para um vetor de clonagem baseado em pUC contendo seleção marcador IGPD bacteriano e um gene de resistência a cassete herbicida para seleção de plantas transgénicas.

EXEMPLO 11

PRODUÇÃO OF PLANTAS TRANSGÉNICAS

pSRN.AGS foi introduzido em tabaco, óleo de colza e tomate (estas plantas são referidas como plantas Alc-GUS) pMOG1006-Fse-SRNAGS e pMOG1006-C5-GUS foram introduzidas em arroz via transformação mediada por Agrobacterium.

Vetores de transformação de plantas contendo cada uma das combinações de cassete dadas acima foram introduzidos em

tabaco e/ou arroz por transformação mediada por Agrobacterium. Os explantes foram analisados por PCR e aqueles contendo inserções intactas foram propagadas por clonagem e transferidas para estufa para crescerem até à floração. RMS30 e 32 foram também introduzidos em tabaco.

pUIRN.AGS foram introduzidos em trigo e milho através de métodos de bombardeamento de projétil, e as plantas transgénicas recuperadas, através de co-bombardeamento com um plasmídeo carregando um marcador selecionável. Outros vetores para testar vários componentes são transformados por bombardeamento com por microprojéteis.

EXEMPLO 12

ANÁLISE DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Estudos na expressão de GUS a partir do promotor AlcA

Em cultura de tecidos

Com vista a avaliar quando as plantas, a seguir à transformação com uma construção contendo um promotor ligado a um gene citotóxico, tal como bamase, será recuperável, particularmente se o promotor tem alguma expressão na fase de *callus* do processo de transformação, a expressão em callus de tabaco foi estudada para determinar quando ou não a expressão foi constitutiva como no caso do promotor GST27, ou quando pode ser induzido por aplicação de etanol.

Plantas de tabaco Alc-GUS (35S-AlcR-nos/AlcA-GUS-nos) com quarto semanas crescidas sob condições de cultura de células padrão foram usadas para testar a expressão do promotor AlcA em tanto com como sem etanol. Discos de folhas foram produzidos e colocados em meio MS suplementado com 3% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de Bacto-agar, 1µg/mL

de 6-BAP e 100ng/mL de NAA como hormonas. Alguns dos discos foram colocados neste meio contendo 0,1% (v/v) de etanol. Após 3 semanas quando a produção de callus tinha progredido, as amostras de callus foram usadas para ensaios de GUS fluorométricos, o resultado do qual é mostrado na Figura 43.

Os níveis de GUS mostraram que no promotor AlcA é vazado no callus e os níveis podem ser aumentados com a adição de etanol ao meio de cultura de tecido de plantas. Portanto, os transgénicos podem ser recuperados usando o promotor AlcA conduzindo um gene restaurador na mesma construção como um promotor conduzindo um gene citotóxico.

Na estufa

O gene comutador AlcA/R foi demonstrado dar bons níveis de indução do gene repórter ou trato nas folhas de tabaco após a adição do etanol indutor químico, quer por aplicação como spray, vapor ou imersão das raízes. (Caddick *et al.*, Salter *et al.*) plantas transgénicas AlcA-GUS de tabaco, colza e tomate foram usadas para examinar o gene de indução em tecidos floras.

Tabaco

1) Um saco de plástico foi selado em torno da haste da flor de tabaco de tabaco AlcA-GUS e um pequeno vaso contendo 50mL de etanol a 5% foi colocado dentro do saco. Após 3 dias as anteras de diferente estádios de gomos florais foram colhidos e ensaiados quando à expressão de GUS. Os resultados são mostrados na Figura 44. Esta mostra os valores de GUS de quatro gomos florais independentes do tipo selvagem, plantas não induzidas por AlcA-GUS e induzidas por AlcA-GUS. Os gomos florais foram medidos em mm e cada barra representa cinco anteras. O gráfico mostra

que em comparação com as plantas AlcA-GUS que não receberam o tratamento com vapor de etanol, as anteras das plantas induzidas contendo nelas altos níveis de GUS.

2) Hastes florais do tipo selvagem e plantas de tabaco Alc-GUS foram cortadas e colocadas em copos contendo 300mL de água, 1%, 2% ou 5% de etanol e deixadas na estufa durante dois dias antes da colheita das anteras a partir dos gomos florais para ensaios fluorométricos GUS. A Figura 45 é um gráfico de barras representando os dados de GUS a partir desta experiência mostrando anteras do tipo selvagem, hastes florais Alc-GUS tratadas com água e 1%, 2% ou hastes florais Alc-GUS tratadas com etanol a 5%. Esta experiência também demonstra que a expressão do gene repórter foi induzida pelo etanol em anteras a níveis acima dos vistos em flores tratadas com água. Níveis de expressão de GUS das anteras AlcA-GUS induzidas eram acima daquelas de uma planta MFS 14-GUS.

3) As raízes de plantas de tabaco AlcA-GUS maduras foram encharcadas, na estufa, com 250mL de água, ou etanol ou 5%. Uma planta 35S-GUS tipo selvagem foram também tratadas com etanol. Dois dias mais tarde os pistilos de vários tamanhos de gomos florais foram dissecados e corados para a atividade GUS. A Figura 46 mostra pistilos de gomos com 9-10mm da água e as plantas Alc-GUS tratadas com etanol 5%. A fotografia claramente demonstra que o tratamento com etanol levou à indução de GUS nos pistilos. As Figuras 47 e 48 mostram a região estigma/estilete dos pistilos dos gomos de 17-22mm e 33-35mm respetivamente, de novo a partir de plantas Alc-GUS tratadas com água e tratadas com etanol. A coloração de GUS está presente em toda esta área em comparação com a planta tratada com água a qual era similar ao tipo selvagem.

4) Plantas Alc-CAT (35S-AlcR-nos/AlcA-CAT-nos) foram também testadas e mostraram um aumento nos níveis do gene repórter em tecidos florais após indução com etanol.

Colza

1) As raízes de plantas de colza (OSR) AlcA-GUS foram encharcadas com 250mL de água, ou 1% ou 2% de etanol tanto no dia 0 como no dia 1. Amostras de flores destas plantas foram depois usadas dois dias após a primeira indução. As amostras usadas para análise fluorométrica de GUS foram anteras de flores imaturas (maturo indicam que estavam completamente abertos), estigma/estiletes das flores maduras, anteras das flores imaturas (gomos florais com as pétalas não abertas), estigma/estiletes das flores imaturas e finalmente o resto dos pistilos florais que incluem os ovários.

A Figura 49 mostra graficamente os dados de GUS e da esquerda para a direita mostra os resultados de Alc-GUS induzido com água, Alc-GUS induzido com etanol a 1% e Alc-GUS induzido com etanol a 2% a partir de plantas de colza. As primeiras duas barras em cada secção representam níveis de GUS de anteras não induzidas e estigma/estilete não induzidos, respetivamente. Cada barra representa três réplicas com cada replica contendo anteras de três flores diferentes ou estigma/estiletes de oito flores diferentes ou ovários de seis flores diferentes.

Os dados data mostram claramente um aumento nos níveis de GUS em tecidos florais em comparação da colza tratada com água com plantas induzidas com etanol. Todos os tecidos examinados nas plantas tratadas com etanol a 2% mostram um aumento de GUS a partir dos dois níveis não induzidos e das plantas controlo tratadas com água.

2) Flores de colza Alc-GUS foram sujeitas a coloração de GUS a seguir à indução com etanol. A Figura 50 é uma fotografia de uma flor Alc-GUS antes da indução e a Figura 51 é fotografia de uma flor da mesma planta, dois dias após emersão da raiz em 250mL de etanol a 5%. Esta mostra que o tratamento levou à indução do gene repórter na região do estigma/estilete assim como os filamentos.

A Figura 52 mostra gomos florais imaturos com as sépalas e flores removidas. A planta tratada com etanol à direita mostra a expressão de GUS na região do estigma/estilete em comparação com o controlo tratado com água à esquerda. As Figuras 53-55 são outros exemplos desta.

A Figura 56 mostra secções do pistilo de plantas Alc-GUS de colza do tipo selvagem induzidas com água. A Figura 57 mostra secções do pistilo de uma planta com a raiz imergida em etanol a 2% dois dias antes das amostras da flor serem tiradas. Esta mostra indução de GUS ao longo da região do pistilo. A Figura 58 mostra pistilos de uma planta tratada com água e uma planta tratada com etanol a 5%. É novamente mostrado que a aplicação de etanol químico levou à indução de GUS nos tecidos femininos.

A Figura 59 mostra a flor de uma experiência em que os estames da flor foi cortado e colocado num copo com etanol a 5% e deixada durante dois dias antes de coloração de toda a inflorescência quanto à atividade de GUS. A coloração azul é visível nos filamentos, sépalas, pétalas e nas regiões de estigma/estilete da flor.

Tomate

Flores de tomate Alc-GUS foram induzidas usando vapor de etanol como descrito acima para as flores de tabaco. Dois dias após indução, as anteras e o pólen foram corados para

detetar a expressão de GUS. Como pode ser visto nas Figuras 60a e 60b, a coloração azul foi observada em ambos os tecidos.

Arroz

Experiências anteriores para testar a indutibilidade da comutação Alc em arroz incluiu um teste hidropónico envolvendo discos de folhas expostas a vapor de etanol durante dois dias antes de serem ensaiadas quanto à atividade de GUS a. Uma vez na estufa, as raízes de plantas completas são imersas em etanol a 1-5% antes e durante a fase de formação/floração da panícula para investigar a indução da expressão de GUS em tecidos florais.

Ensaio de GUS

O material floral foi crescido em 2-300µL de um tampão de extração (tampão de fosfato de sódio 100mM a pH 7, EDTA 10mM, 0,1% de Triton X-100, 1% de Sarcosyl, b-mercaptoetanol 10mM). As amostras foram centrifugadas numa microcentrifuga durante 15 min e 5 µL do sobrenadante foram usados para o ensaio de proteína Bradford com BSA como padrão. Foram diluídos 20 µL a 1 para 5 com tampão de extração e 400 µL de tampão do ensaio (o mesmo para o tampão de extração, exceto se contém 1 mM 4-MUG e 20% metanol). Foram tomados 100 µL (amostra T0) e adicionados a 900 µL de tampão de paragem (0,2M de carbonato de sódio) e o resto foi incubado a 37°C durante duas horas antes de tomar mais 100 µL (amostras T2) para adicionar aos 900 µL de tampão de paragem.

A florescência das amostras foi medida num espetrofotómetro e o GUS foi representado como nM 4M U por mg de proteína por hora.

Trigo

O tecido de Scutellum é bombardeado com pUIRN.AGS e o tecido exposto a vapor de etanol. A coloração quanto à expressão de GUS é realizada 2-3 dias depois, quando numerosas manchas azuis são vistas indicando que o promotor AlcA está a conduzir a indução da expressão de GUS.

As plantas Alc-GUS transgénicas obtidas são crescidas até à maturação e as sementes colhidas, a expressão de GUS indutível é determinada nas plantas descendência do mesmo modo como descrito acima para arroz.

Histoquímica de GUS

Para a coloração de GUS, foi usado o protocolo de Blume e Grierson (1997).

Investigação da esterilidade

1) Plantas estéreis masculinas

a) as plantas estéreis masculinas esporofíticas geradas por transformação com cassete A são identificadas pela ausência de pólen ou pela presença de pólen mosto. A semente é produzida por retrocruzamento com Tabaco tipo selvagem como dador de pólen.

b) as plantas estéreis gametofíticas ou geradas por transformação com cassete B são identificadas usando coloração de vitalidade no pólen, 50% do pólen é estéril, 50% fértil.

2) Plantas estéreis femininas

Plantas estéreis femininas esporofíticas geradas por transformação com cassete F são identificadas através da sua incapacidade para serem polinizadas por cruzamento com pólen tipo selvagem.

Plantas restauradoras em ambos os casos geradas por transformação com cassetes E e G are autopolinizadas, a descendência crescida e as linhas homozigóticas selecionadas de modo usual pela seleção em kanamicina da semente T2.

Restabelecimento da fertilidade indutível

A descendência do cruzamento entre plantas estéreis esporofiticamente e plantas tipo selvagem é esperado que segreguem 1:1 de esterilidade com a presença do transgene e é selecionada nos estados precoces de crescimento por análise de PCR. Experiências de indução são realizadas para investigar o restabelecimento da fertilidade, dado que estas plantas estéreis podem ser tratadas com etanol através da de imersão das raízes ou aplicação de spray ou vapor para induzir a expressão de barstar nos tecidos relevantes. É esperado que esta indução num momento apropriado permita que ocorra a autopolinização e a produção de semente a seguir à qual pode ser facilmente avaliada. As plantas homozigóticas são selecionadas a partir da descendência resultante pelos meios usuais e usada para testar o restabelecimento constitutivo através de cruzamento com plantas restauradoras homozigóticas.

O retrocruzamento das plantas C5-barnase.AlcA-barstar com plantas tipo selvagem ou permitindo autopolinização para continuar, porém, resulta na recuperação de uma população, 50% da qual é totalmente fértil e 50% produzindo pólen do qual só 50% é fértil. Estas plantas podem porém ser induzidas com um spray de etanol, imersão das raízes ou tratamento de vapor para expressarem barstar no pólen em desenvolvimento para permitir autopolinização. As plantas homozigóticas neste caso são 100% estéreis, enquanto que as plantas hemizigóticas são 50% estéreis. As diferenças nos

resultados obtidas por coloração permite retirar conclusões acerca da eficiência da indução e autopolinização.

Restabelecimento constitutivo da fertilidade por polinização cruzada

O cruzamento das plantas estéreis masculinas com a planta masculina restauradora é conseguido através da transferência do pólen da planta restauradora para o pistilo da planta estéril masculina (após remoção de todas as anteras que estejam presentes mesmo considerando que estas vão conter somente pólen morto.) O pistilo polinizado é então ensacados para prevenir a contaminação pelo tipo selvagem ou outro pólen no ambiente. As sementes produzidas são colhidas. A descendência é crescida e a produção de pólen é observada e medida. O restabelecimento da fertilidade neste modo conduz à produção de pólen normal.

O cruzamento das plantas estéreis femininas é obtida através da transferência de pólen destas plantas para os pistilos das plantas restauradoras da fertilidade feminina, novamente após a remoção das anteras a partir destas plantas. A flor foi ensacada como acima. As sementes produzidas são colhidas. A descendência foi crescida e as flores ensacadas. A capacidade destas plantas para se autopolinizarem é observada. O restabelecimento da fertilidade por esta via permite que a autopolinização ocorra. Do mesmo modo são analisadas as plantas geradas por transformação com cassetes E e F isto é femininas estéreis e carregando o gene restaurador masculino e as cassetes A e G isto é masculinas estéreis e carregando o gene restaurador feminino.

REFERÊNCIAS

Aarts *et al.*, Transposon Tagging of a Male Sterility Gene in Arabidopsis. Nature, 363:715-717

Ahn, S, Tanksley, S.D, (1993). Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. Proc Nat Acad Sci 90: 7980-7984.

Albani D., Robert L.S., Donaldson P.A., Altosaar I., Amison P.G., Fabijanski S.F. (1990) Characterization of a pollen-specific gene family from Brassica napus which is activated during early microspore development. Plant Mol. Biol. 15:605-622

Aoyama *et al.* (1995) Plant Cell 7, 1773-

Atkinson, A.H., Heath, R.L., Simpson, R.J., Clarke,A.E., and Anderson, M.A. (1993). Proteinase inhibitors in Nicotiana alata stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. Plant Cell 5, 203-213.

Becker D *et al.* Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant Journal 5: 299-307 (1994)

Budelier, K.A., Smith, A.G., and Gasser, C.S. (1990). Regulation of a stylar transmitting tissue-specific gene in wild type and transgenic tomato and tobacco. Mol. Gen. Genet 224, 183-192.

Mark X. Caddick, Andrew J.Greenland, Ian Jepson, Klaus-Peter Krause, Nan Qu, Kay V.Riddell, Michael G.Salter, Wolfgang Schuch, Uwe Sonnewald and A.Brian Tomsett (1998) An etanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. Nature Biotechnology Vol16, 177-180.

Paul Christou in plant Mol. Biol. 35: 197-203 (1997)

De Block, M., Debrouwer, T., Moens, T. (1997). The development of a nuclear male sterility sistema in wheat. Expression of the

barnase gene under the control of tapetum specific promoters. Theor Appl Genet. 95, 125-131.

H.P Doring (1989). Tagging genes with Maize Transposable elements. An Overview. Maydica 34 (1989) 73-88.

Elliot, R. C., Betzner, A.S., Huttner ,E., Oakes, M. P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P., and Smyth, D. R. (1996) AINTEGUMENTA, an APELATA2-like gene of Arabidopsis with pleiotrophic roles in ovule development and floral organ growth. Plant Cell 8" 155-168

Ficker, M., Wemmer, T., and Thompson, R.D (1997). A promotor directing high level expression in pistils of transgenic plants. Plant Mol Biol 35, 425-431

Gallie,D.R, Sleat, D.E, Watts, J.W, Turner, P.C, Wilson, T.M.A, (1987) A comparison of eukaryotic viral 5' leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. Nucleic Acids Research 15: 8693-8710.

Gatz C *et al.* (1991) Mol Gen Genet 227, 229-237

Gatz C *et al.* (1992) Plant J 2, 397-404

Goldman, M.H., Goldberg, R.B., Mariane, C. (1994). Female steril tobacco plants are produced by stigma specific cell ablation. EMBO J13: 2976-2984.

Hamilton, D.A., Bashe, D.M., Stinson, J.R., Mascarenhas, J.P. (1989). Characterisation of a pollen specific genomic clone from maize. Sex Plant Reprod 2, 208-212.

Hanson, D.H., Hamilton, D.A., Travis, J.L., Bashe, D.M., Mascarenhas, J.P. (12989). Characterisation of a pollen specific cDNA clone from Zea Mays, and its expession. The Plant Cell 1, 173-179

Hasselhof. J and Gerlach W.L, 1988) Nature Vol 334: 585-591.

Hiei Y *et al.* Efficient transformation of rice mediated by Agrobacterium. Plant Journal 6: 271-282 (1994)

Hiei Y *et al.* Rice transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens. Plant Mol Boil 35: 205-218 (1997)

Hird, D.L., Worrall, D., Hodge, R., Smartt, S., Paul, W and Scott, R (1993). The anther-specific protein encoded by the Brassica napus and Arabidopsis thaliana A6 gene displays similarity to β-1,30glucanases. The Plant Journal 4(6), 1023-1033.

Izawa T, Ohnishi T, Toshitsugu N, Ishida N, Hiroyuki E, Hashimoto H, Itoh K, Terada R, Wu C, Miyazaki C, Endo T, Iida S and Shimaamoto K (1997). Transposon tagging in rice. Plant Mol Biol 35: 219-229

Jepson, I, Lay, V., Holt, D.C., Bright, W.J., and Greenland, A.J.,(1994). Cloning and characterisation of maize herbicide safeer-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. Plant Molecular Biology 26: 1855-1866.

Kamalay, J.C., and Goldberg, R.B. (1980). Regulation of structural gene expression in tobacco. Cell 19, 935-946

Kang H.G., Noh Y.S., Chung Y.Y., Costa M.A., An K., An G. (1995). Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco. Plant Mol. Biol. 29:1-10

De Block, M., Debrouwer, T., Moens, T. (1997). The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. Theor Appl Genet. 95, 125-131.

Kempin., S.A., Liljigren, S.J., Block, L.M., Rounsley, S.D., and Yanofsky, M.F. (1997). Targeted disruption in Arabidopsis. Nature Vol 389

Kilian A, Chen J, Han F, Steffenson B and Kleinhofs A (1997). Towards map based cloning of the barley stem rust resistance genes RpgI and rpg4 using rice as an intergenomic cloning vehicle. Plant Mol Biol 35: 187-195.

Koes R.E., Spelt C.E., van Den Elzen P.J.M., Mol J.N.M.. (1989). Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of Petunia hybrida. Gene 81:245-257
Kozak, M (1989), J. Cell. Biol 108: 229-241

Kurata, N, Moore G, Nagamura Y, Foote T, Yano M, Minobe Y, Gale M. (1994) Conservation of genome structure between rice and wheat. Bio/Technology 12:276-278

Lloyd *et al.* (1994) Science 266, 436-439

Lotan,T., Ori, N., and Fluhr, R. (1989). Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. Plant Cell 1, 881-887

Mascarenhas D, Mettler I.J, Pierce D.A, Lowe, H.W (1990) Intron mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. Plant Mol Biol 15: 913-920.

Mariani, C., De Beuckeleer, Marc., Truettner, J., Leemans, J., and Goldberg, R.B (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature Vol 347, 737-741

Celestina Mariani., Veronique Gossele., Marc De Beuckeleer., Marc De Block., Robert B. Goldberg., Willy De Greef and Jan Leemans (1992). A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature Vol 357, 384-387.

Merlo, Donald J.; Folkerts, Otto. (Dowelanco, USA). PCT Int. Appl., 117 pp. CODEN: PIXXD2. WO 9713402 A1 970417. Synthetic genes for d-endotoxins optimized for expression in plants and their in geração of lepidopteran-resistant plants.

Mitchell and Tijan (1989) Science 245, 371-378.
Moore G, Devos K.M, Wang Z, Gale M.D. (1995). Cereal genome evolution. Current Biol 5: 737-739

Nadeau, J.A., Zhang, X.S., Li, J and O'Neill, S.D. (1996). Ovule development: Identification of stage and tissue specific cDNAs. The Plant Cell 8, 213-239

Nacken *et al*: Mol and Gen Genet. 229, 129-136, (1991)

Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. 1993). Pollen-estigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. Plant Cell 5., 1325-1335.

Nelson, O.E., and Clary, G.B. (1952) J Hered. 43, 205-210

Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S., and Fluhr, R. (1990). A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-realated proteins superclass. EMBO J 9, 3429-3436

Picard *et al.* (1993) TICB 3, 278-280

Ptashne (1988) Nature 355, 683-689

Ptashne and Gann (1990) Nature 346, 329-331

Robinson-Beers, KK., Pruitt, R.E., and Gasser, C.S. (1992). Ovule development in wild type Arabidopsis and two female sterile mutants. Plant Cell 4, 1237-1249

M.G. Salter, J.A. Paine, K.V. Riddell, I. Jepson, A.J. Greenland, M.X. Caddick and A.B. Tomsett (1998). Characterisation of the etanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. Plant Journal 16 (1) 127-132

Seed, Brian; Haas, Jurgen. (The General Hospital Corp., USA). U.S., 36 pp. Cont.-in-part of U. S. Ser. No. 324,243. CODEN: USXXAM. US 5795737 A 980818. Patent written in English. Application: US 95-532390 950922. Priority: US 94-324243 940919 CAN 129:171505. Modulating efficiency of expression of foreign genes in host cells by manipulation of codon usage.

Seurinck J., Truettner J., Goldberg R.B. (1990). Nucleotide sequence of an anther-specific gene. Nucleic Acids Res. 18:3403-3403

Simon *et al.* (1996) Nature 384, 59-62

Spena, A., Estruch, J.J., Prensen, E., Nacken, W., Van Onckelen, H., Sommer, H. (1992). Anther-specific expression of the rolB gene of Agrobacteriun rhizogenes increases IAA content in anthers and alters anther development in whole flower growth. Theor Appl Genet 84, 520-527

Theissen G., Strater T., Fischer A., Saedler H. (1995). Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of AGAMOUS-like MADS-box genes from maize. Gene 156:155-166

Tsuchiya T., Toriyama K., Ejiri S., Hinata K. (1994). Molecular characterization of rice genes specifically expressed in the anther tapetum. Plant Mol. Biol. 26:1737-1746

Tsuchiya, T., Toriyama, K., Yoshikawa, M., Ejiri, S., Hinata, K., (1995). Tapetum specific expression of the gene for aan endo-β-1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco. Plant Cell Phys. 36, 487-494.

Twell, D., Wing, R.A., Yamaguchi, J., McCormick, S. (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. Mol Gen Genet 217, 240-245.

Twell, D., Yamaguchi, J., McCormick, S. (1990). Pollen specific gene expression in transgenic plants: Coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. Development 109, 705-713.

Vasil.V, Clancy. M, Ferl, R.J, Vasil. I.K, Hannah. L.C, (1989) Increased Gene Expression by the First I ntron of Milho Shrunken-1 locus IN Grass Species. Plant Phys 91: 1575-1579.

Vasil V *et al.* Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. Biotechnology 11:1553-1558 (1993).

Weeks JT *et al.* Rapid production of multiple independant lines of fertile transgenic wheat. Plant Phys 102:1077-1084 (1993)

Wegener, D, Steinecke P, Herget T, Petereit I, Philipp C, Schreier P.H, (1994) Expression of a repórter gene is reduced by a ribozyme in transgenic plants. Mol Gen Genet 245: (465-470)

Wright, S.Y., Suner, M-M., Bell, P,J., Vaudin, M., and Greenland,A.J (1993) Isolation and characterisation of male flower cDNA'S from maize. The Plant Journal 3, 41-49.

Xu, H., Davis, S.P., Kwan, B.Y.H., O'Bries, A.P., Singh, M., Knox, R.P. (1993) Haploid and diploid expression of a Brassica Campestris anther specific promotor de gene in Arabidopsis and tobacco. Mol Gen Genet 239, 58-65.

Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K., Hinata, K (1997). Tapetum specific expression of the Osg6B promotor-β-glucuronidase gene in transgenic rice. Plant Cell Reports 16, 363-367. Zou, J.T., Zhan,X.Y., WU, H.M., Wang, H., Cheung, A.Y. (1994).

Characterisation of a rice pollen-specific gene and its expression. Am J Bot 81, 552-561.

WO94/13822 Methods for stable transformation of wheat, Ciba Geigy.

Lisboa, 26 de Junho de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Uma expressão de cassetes compreendendo:
   (a) um primeiro promotor de gene o qual é um promotor específico de tapete, antera, estames e/ou pólen;
   (b) um gene desregulador que codifica um produto capaz de desregular a fertilidade masculina operativamente ligada ao primeiro gene promotor;
   (c) um segundo promotor de gene o qual é uma flor ovário, óvulo, pistilo, estilete, estigma, transmissor de trato e/ou promotor específico de placenta opcionalmente operativamente ligado a um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão;
   (d) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade feminina operativamente ligado a um segundo promotor de gene;
   (e) um terceiro promotor que é indutível através da aplicação de um indutor químico exógeno opcionalmente operativamente ligado com um ou mais potenciadores translacionais ou sequências de intrão; e
   (f) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade masculina operativamente ligado a um segundo promotor de gene;

2. Uma expressão de cassetes compreendendo:
   (a) um primeiro promotor de gene o qual é um ovário de flor, óvulo, pistilo, estilete, estigma, transmissor de trato e/ou promotor específico de placenta;

(b) um gene desregulador que codifica um produto capaz de desregular a fertilidade feminina operativamente ligado ao primeiro gene promotor;
(c) um segundo promotor de gene o qual é um promotor específico de tapete, antera, estames e/ou pólen opcionalmente operativamente ligado a um ou mais potenciadores ou sequências de intrão;
(d) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade masculina operativamente ligado a um segundo promotor de gene;
(e) um terceiro promotor que é indutível pela aplicação de um indutor químico exógeno opcionalmente operativamente ligado a um ou mais potenciadores ou sequências de intrão; e
(f) um gene restaurador que codifica um produto capaz de restabelecer a fertilidade feminina operativamente ligado a um segundo promotor de gene;

3. Uma cassete de expressão de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o gene desregulador codifica um produto o qual é barnase ou fosfato trealose fosfatase (TPP).

4. Uma cassete de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 3 em que o terceiro promotor de gene é o promotor Alc A ou o promotor GST-27.

5. Tecido de planta transformado compreendendo uma ou mais das cassetes de expressão de qualquer uma das reivindicações 1 até 4.

6. Uma planta, o genoma da qual compreende a cassete de expressão da reivindicação 1.

7. Uma planta, cujo genoma compreende a cassete de expressão da reivindicação 2.

8. Uma planta de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7, em que a referida planta é selecionado a partir do grupo que consiste em trigo, arroz, milho, tomate, girassol, beterraba sacarina, canola, algodão, soja e outros vegetais.

9. Planta de acordo com a reivindicação 6, em que a referida planta é homozigótica para a cassete de expressão da reivindicação 1.

10. Planta de acordo com a reivindicação 7, em que a referida planta é homozigótica para a cassete de expressão da reivindicação 2.

Lisboa, 26 de Junho de 2012

Fig.1.

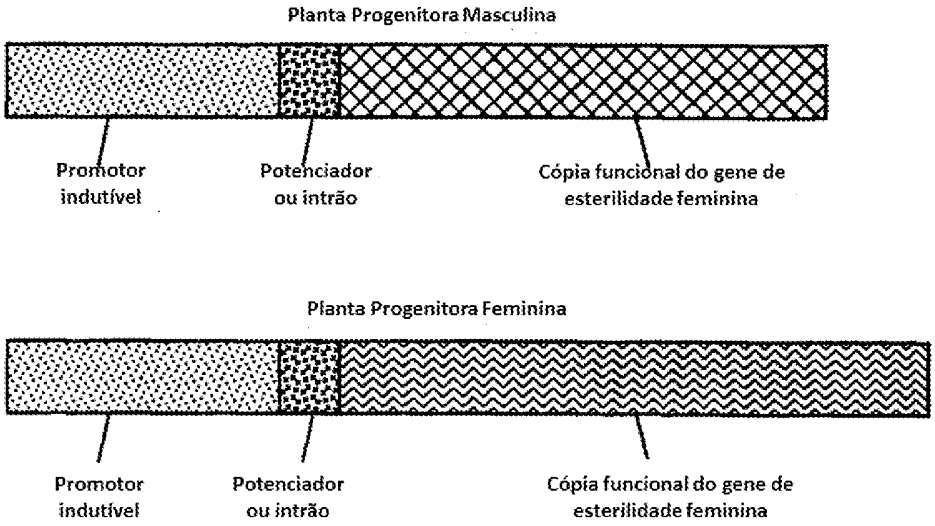

Planta Progenitora Masculina
Promotor indutível
Potenciador ou intrão
Cópia funcional do gene de esterilidade feminina
Planta Progenitora Feminina
Promotor indutível
Potenciador ou intrão
Cópia funcional do gene de esterilidade feminina

Fig.3.

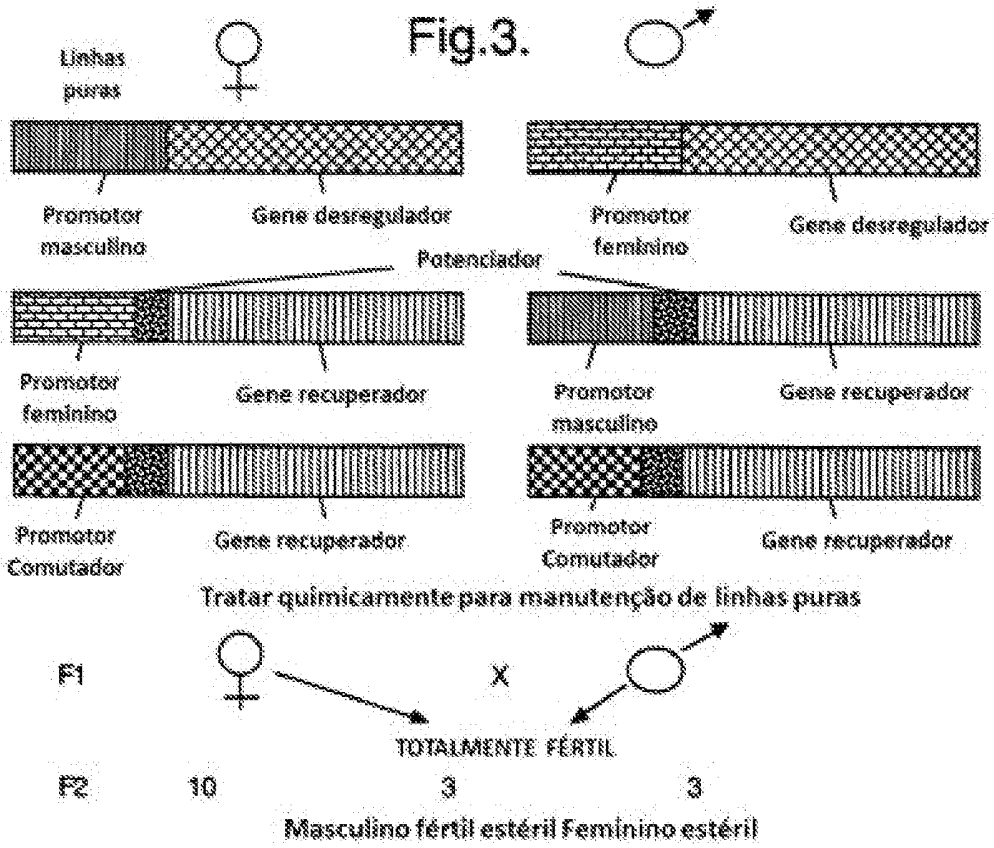

Linhas puras
Promotor masculino
Gene desregulador
Promotor feminino
Gene desregulador
Potenciador
Promotor feminino
Gene recuperador
Promotor masculino
Gene recuperador
Promotor Comutador
Gene recuperador
Promotor Comutador
Gene recuperador
Tratar quimicamente para manutenção de linhas puras
F1
X
TOTALMENTE FÉRTIL
F2
10
3
3
Masculino fértil estéril Feminino estéril

Fig.2A.

Progenitor masculino — Progenitor feminino

fsR^{FCS} -------- / fsR^{FCS} --------- X msR^{MCS} ==== / msR^{MCS} ====

Gâmetas: fsR^{FCS} -------- msR^{MCS} ====

F1: fsR^{FCS} / ==== msR^{MCS} / --------

nota: R^{FCS} e R^{MCS} são fertilidade restauráveis dominante. Ms e -------- São alélicos, fs e ==== São alélicos

TODAS AS PLANTAS F1 SÃO TOTALMENTE FÉRTIL

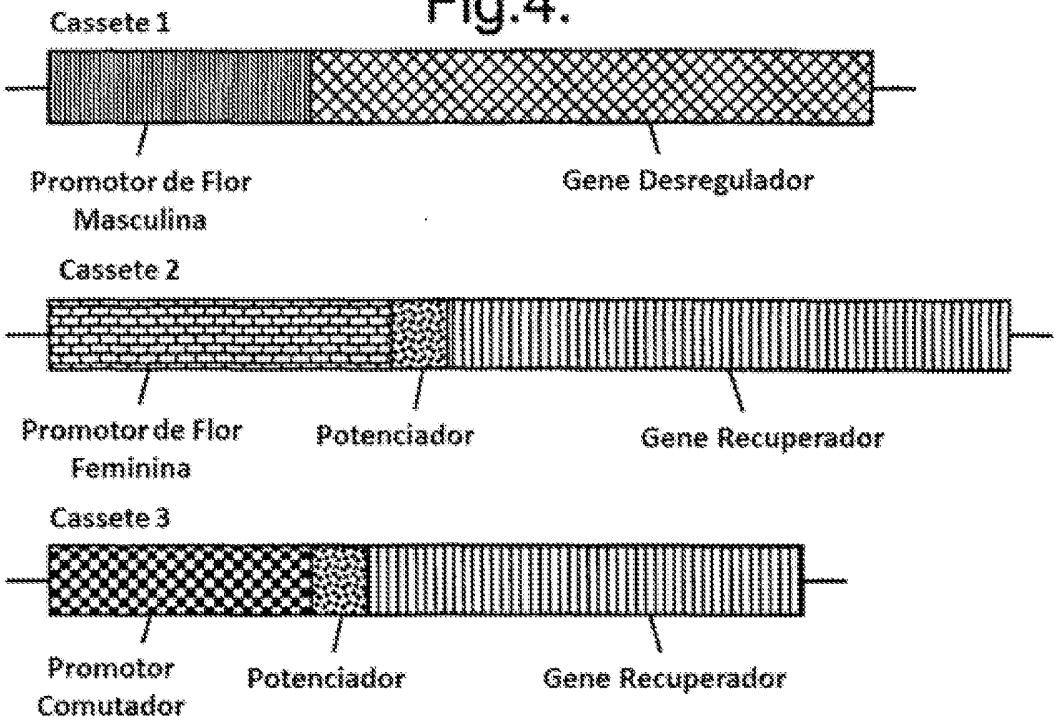
Fig.2B.

Pollen → / Células do ovo ↓	fsR^{FCS} --------	fsR^{FCS} msR^{MCS}	msR^{MCS} ====	==== --------
fsR^{FCS} --------	FS	FS	FF	FF
fsR^{FCS} msR^{MCS}	FS	FS,MS	MS	FF
msR^{MCS} ====	FF	MS	MS	FF
==== --------	FF	FF	FF	FF

Onde MS=estéril masculino FS=estéril feminino FF=totalmente fértil

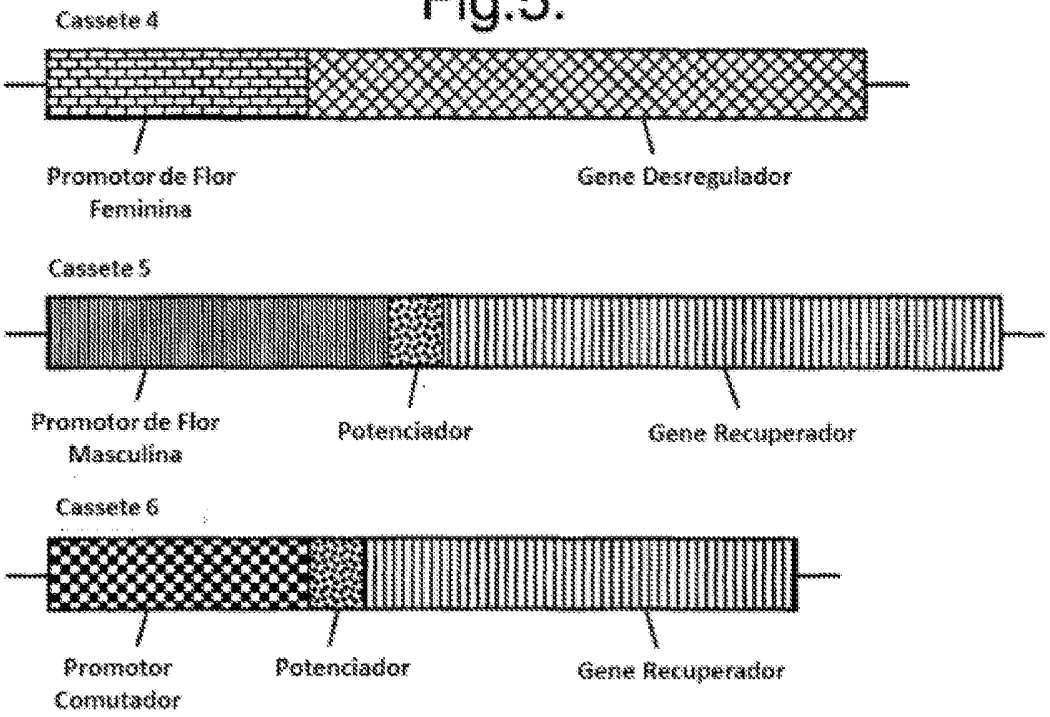
Segregação é 3 MS 3FS, 9FF, 1 MS and FS

Fig.4.



Estas cassetes podem ser no mesmo vetor de transformação

Fig.5.



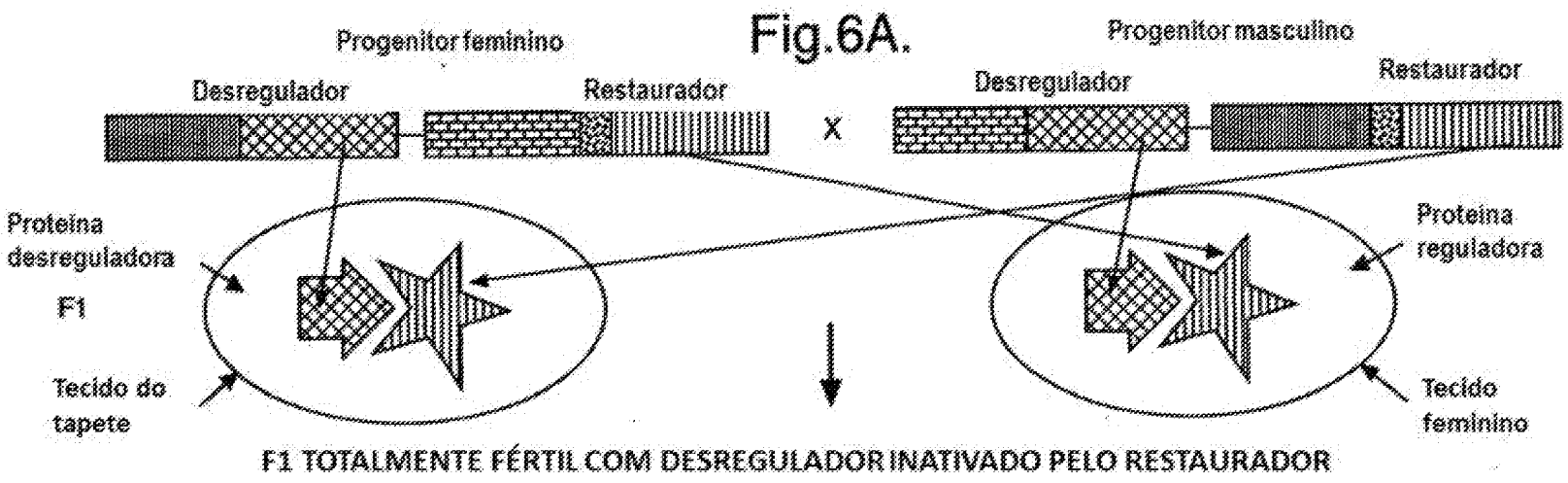


Fig.6A.
Progenitor feminino
Desregulador
Restaurador
X
Progenitor masculino
Desregulador
Restaurador
Proteína desreguladora
F1
Tecido do tapete
Proteína reguladora
Tecido feminino
F1 TOTALMENTE FÉRTIL COM DESREGULADOR INATIVADO PELO RESTAURADOR

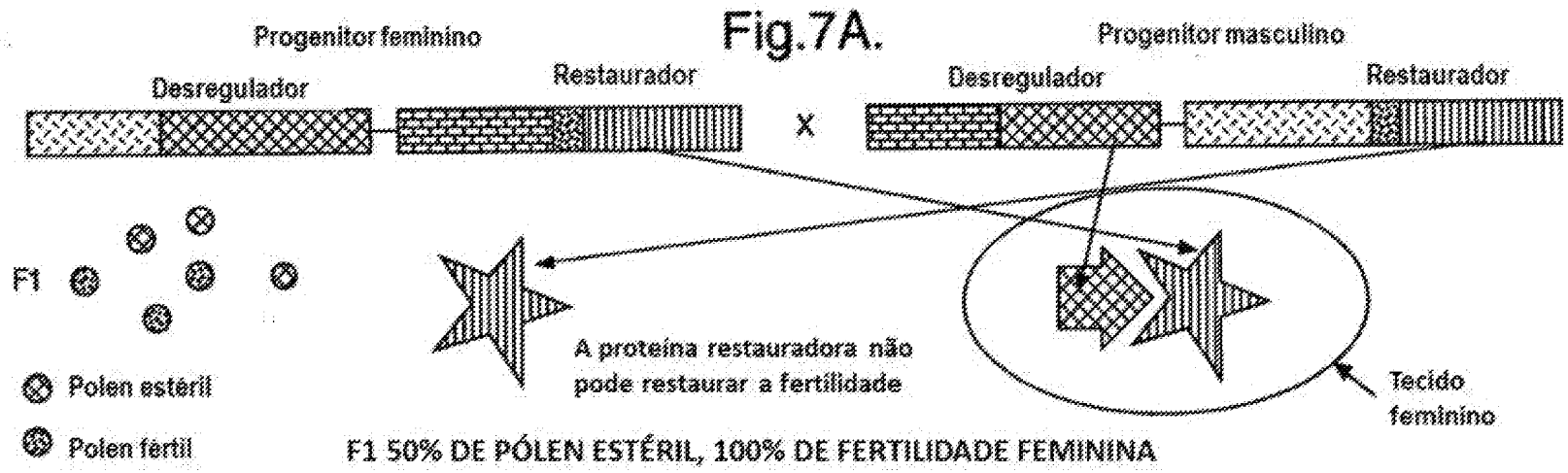


Fig.7A.
Progenitor feminino
Desregulador
Restaurador
X
Progenitor masculino
Desregulador
Restaurador
F1
Polen estéril
Polen fértil
A proteína restauradora não pode restaurar a fertilidade
Tecido feminino
F1 50% DE PÓLEN ESTÉRIL, 100% DE FERTILIDADE FEMININA

Fig.6b.

Progenitor feminino

$MSR^{F}_{R}CS$ -------

$MSR^{F}_{R}CS$ -------

Progenitor masculino

$FSR^{M}_{R}CS$ *****

$FSR^{M}_{R}CS$ *****

Gâmetas

célula do óvulo: $MSR^{F}_{R}CS$ -------

Pólen: $FSR^{M}_{R}CS$ *****

F1

$MSR^{F}_{R}CS$ -------

***** $FSR^{M}_{R}CS$

nota: $MSR^{F}R^{CS}$ e $FSR^{M}R^{CS}$ são introduzidos transgenes. Na F1 há hemizigotos com os alelos nulos de tipo selvagem, *****,e ------ resp.

TODAS AS PLANTAS PRODUZEM 100% DE GÂMETAS FÉRTEIS MASCULINOS E FEMININOS

Fig.6c.

Pólen → / Célula de óvulo ↓	$MSR^{F}_{R}CS$ -------	$MSR^{F}_{R}CS$ $FSR^{M}_{R}CS$	$FSR^{M}_{R}CS$ *****	------- *****
$MSR^{F}_{R}CS$ -------	MS	FF	FF	MS
$MSR^{F}_{R}CS$ $FSR^{M}_{R}CS$	FF	FF	FF	FF
***** $FSR^{F}_{R}CS$	FF	FF	FS	FS
***** -------	MS	FF	FS	FF

Onde MS=Masculino estéril FS=Masculino estéril FF=totalmente fértil

Segregação é 3M, 3 FS, 10FF

Fig.7b.

Progenitor feminino

$MSR^{F}R^{CS}$ ------

$MSR^{F}R^{CS}$ ------

Progenitor masculino

$FSR^{M}R^{CS}$ *****

$FSR^{M}R^{CS}$ *****

Gâmetas

Células de óvulo: $MSR^{F}R^{CS}$ ------

Pólen: $FSR^{M}R^{CS}$ *****

F1

$MSR^{F}R^{CS}$ ------

***** $FSR^{M}R^{CS}$

nota: $MSR^{F}R^{CS}$ e $FSR^{M}R^{CS}$ são transgenes introduzidos. Na F1 são hemizigotos com alelos nulos do tipo selvagem, *****, e ------ rep.

TODAS AS PLANTAS F1 PRODUZEM 50% DE PÓLEN FÉRTIL

Fig.7c.

Pólen → / Células de óvulo ↓	$MSR^{F}R^{CS}$ ------	$MSR^{F}R^{CS}$ $FSR^{M}R^{CS}$	***** $FSR^{M}R^{CS}$	***** ------
$MSR^{F}R^{CS}$ ------	Totalmente Fértil			
$MSR^{F}R^{CS}$ $FSR^{M}R^{CS}$				
***** $FSR^{M}R^{CS}$				
***** ------	TODOS OS OUTROS SEGREGANDO QUANTO À ESTERILIDADE COMO RESULTADO DE 50% DE PÓLEN FÉRTIL			

FF

Fig.8.

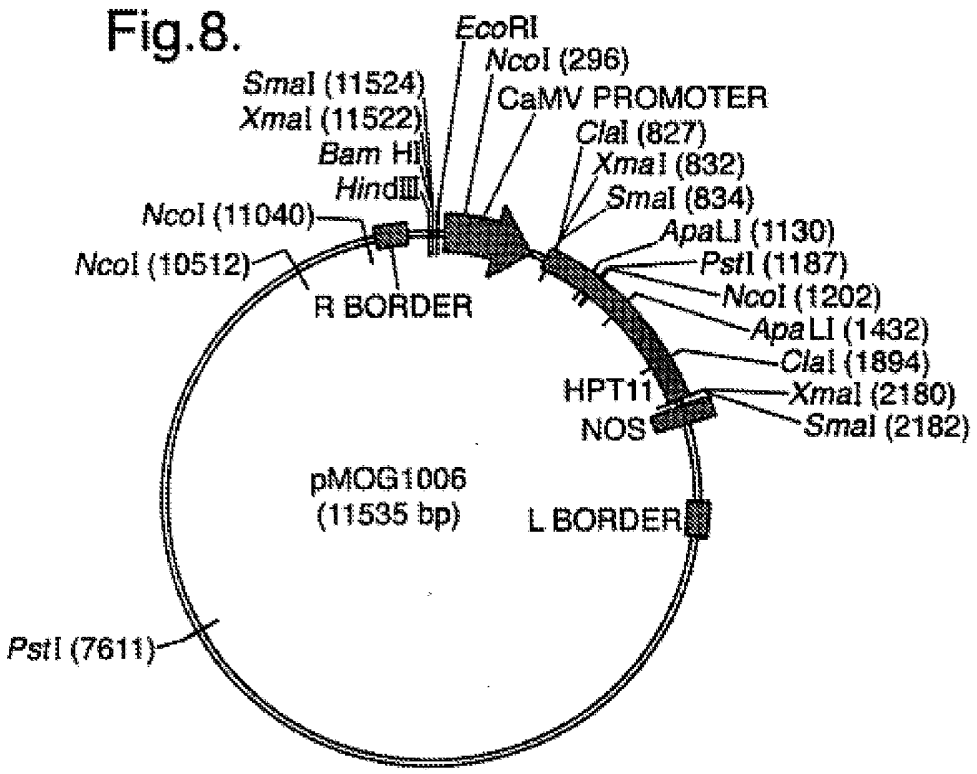

EcoRI
NcoI (296)
SmaI (11524)
XmaI (11522)
CaMV PROMOTER
ClaI (827)
XmaI (832)
Bam HI
HindIII
SmaI (834)
NcoI (11040)
ApaLI (1130)
NcoI (10512)
PstI (1187)
NcoI (1202)
R BORDER
ApaLI (1432)
ClaI (1894)
HPT11
XmaI (2180)
NOS
SmaI (2182)
pMOG1006
(11535 bp)
L BORDER
PstI (7611)

Fig.9.

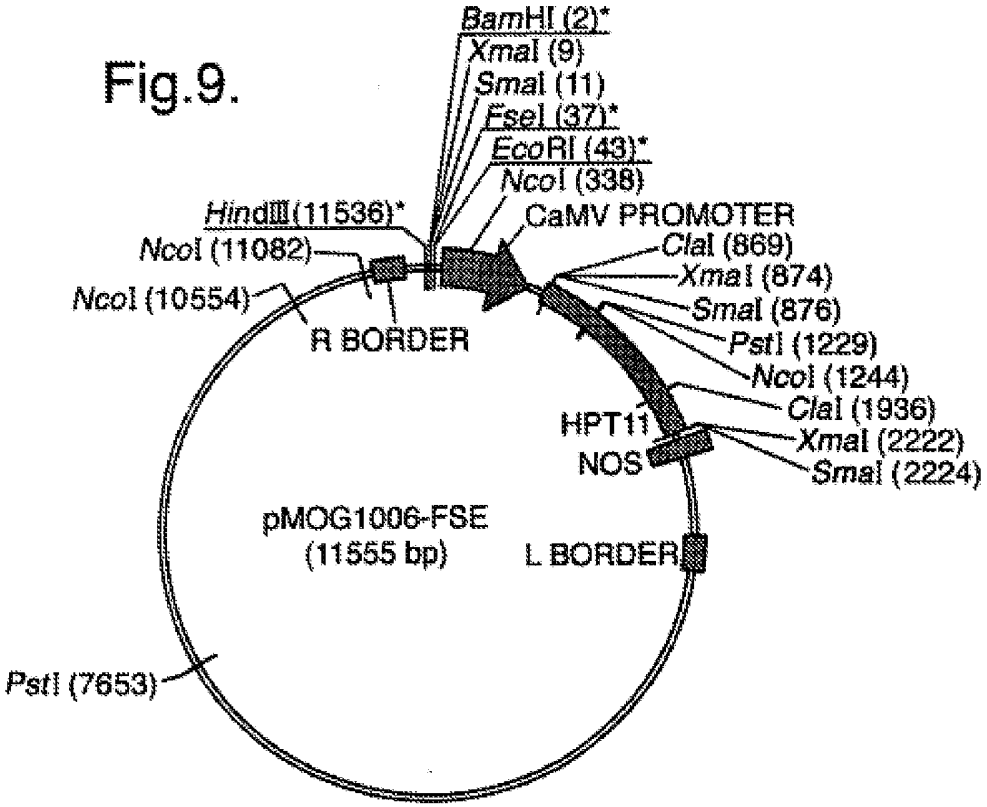

BamHI (2)*
XmaI (9)
SmaI (11)
FseI (37)*
EcoRI (43)*
NcoI (338)
HindIII (11536)*
CaMV PROMOTER
NcoI (11082)
ClaI (869)
XmaI (874)
NcoI (10554)
SmaI (876)
R BORDER
PstI (1229)
NcoI (1244)
ClaI (1936)
HPT11
XmaI (2222)
NOS
SmaI (2224)
pMOG1006-FSE
(11555 bp)
L BORDER
PstI (7653)

Fig.10.

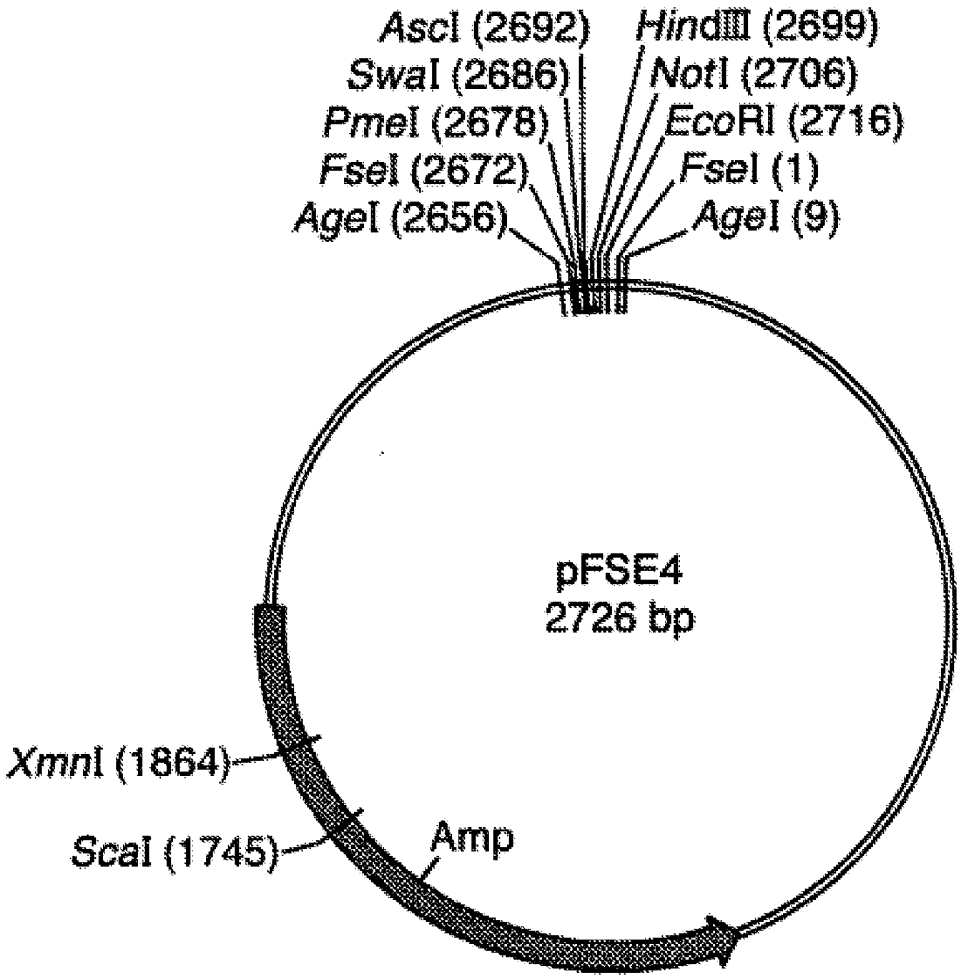
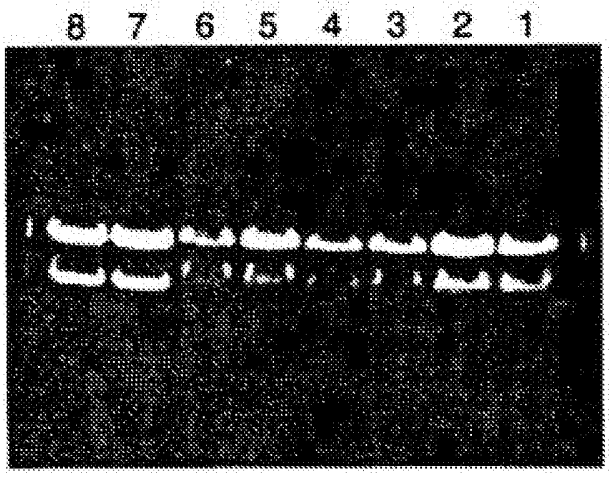

AscI (2692)
HindIII (2699)
SwaI (2686)
NotI (2706)
PmeI (2678)
EcoRI (2716)
FseI (2672)
FseI (1)
AgeI (2656)
AgeI (9)
pFSE4
2726 bp
XmnI (1864)
ScaI (1745)
Amp

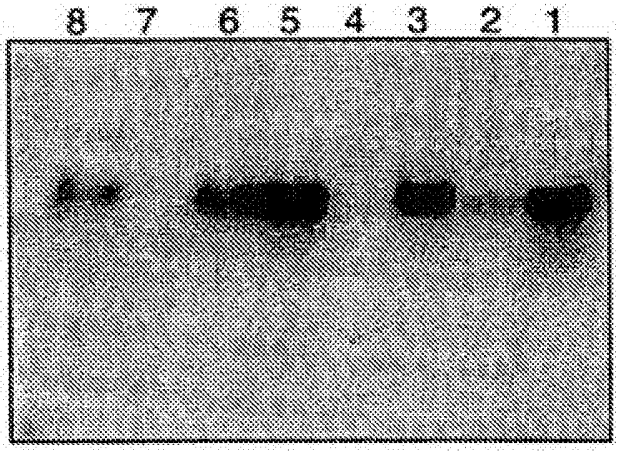
Fig.11.

ANÁLISE DE NORTHERN

Gel corado com brometo de etídio



Hibridação Northern com GST II-27



1 = Bandeira induzida
2 = Endosperma não induzido
3 = Endosperma induzido
4 = Embrião induzido
5 = Embrião não induzido
6 = Embrião induzido
7 = Endosperma não induzido
8 = Endosperma induzido

14 d.a.p.

24 d.a.p.

Fig.12.

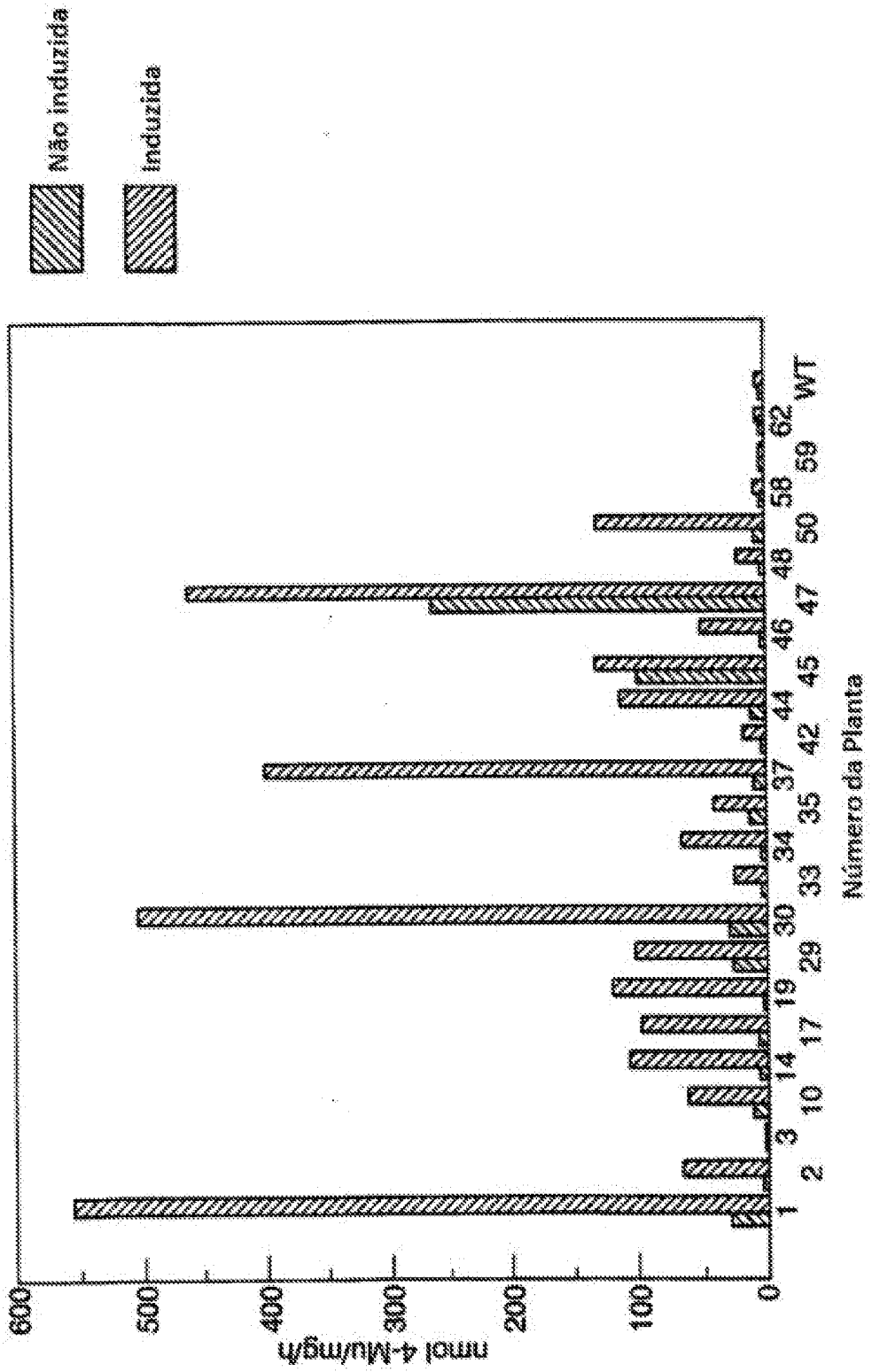

Não induzida
Induzida
nmol 4-Mu/mg/h
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
10
14
17
19
29
30
33
34
35
37
42
44
45
46
47
48
50
58
59
62
WT
Número da Planta

Fig.13.

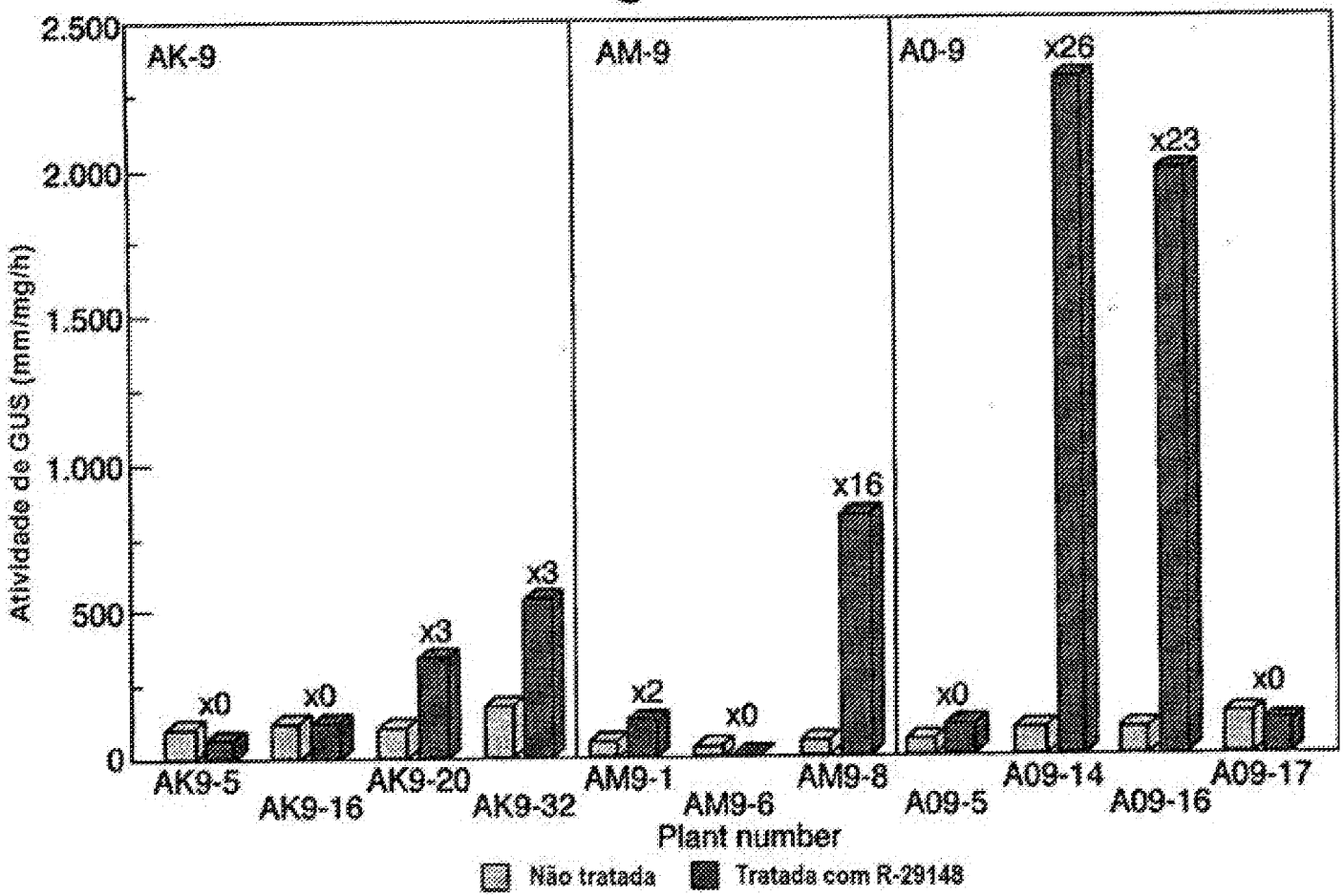

2.500
2.000
1.500
1.000
500
0
Atividade de GUS (mm/mg/h)
AK-9
AM-9
A0-9
x0
x0
x3
x3
x2
x0
x16
x0
x26
x23
x0
AK9-5
AK9-16
AK9-20
AK9-32
AM9-1
AM9-6
AM9-8
A09-5
A09-14
A09-16
A09-17
Plant number
Não tratada
Tratada com R-29148

Fig.14.

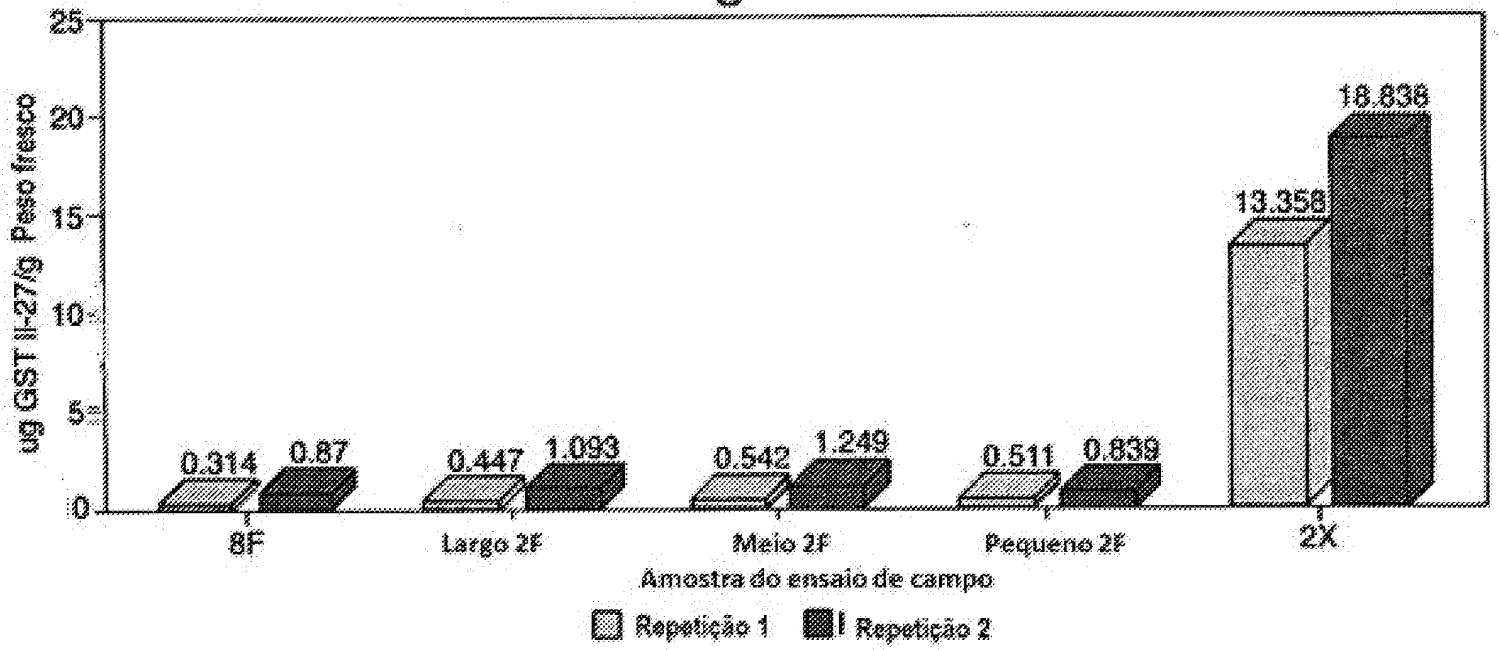
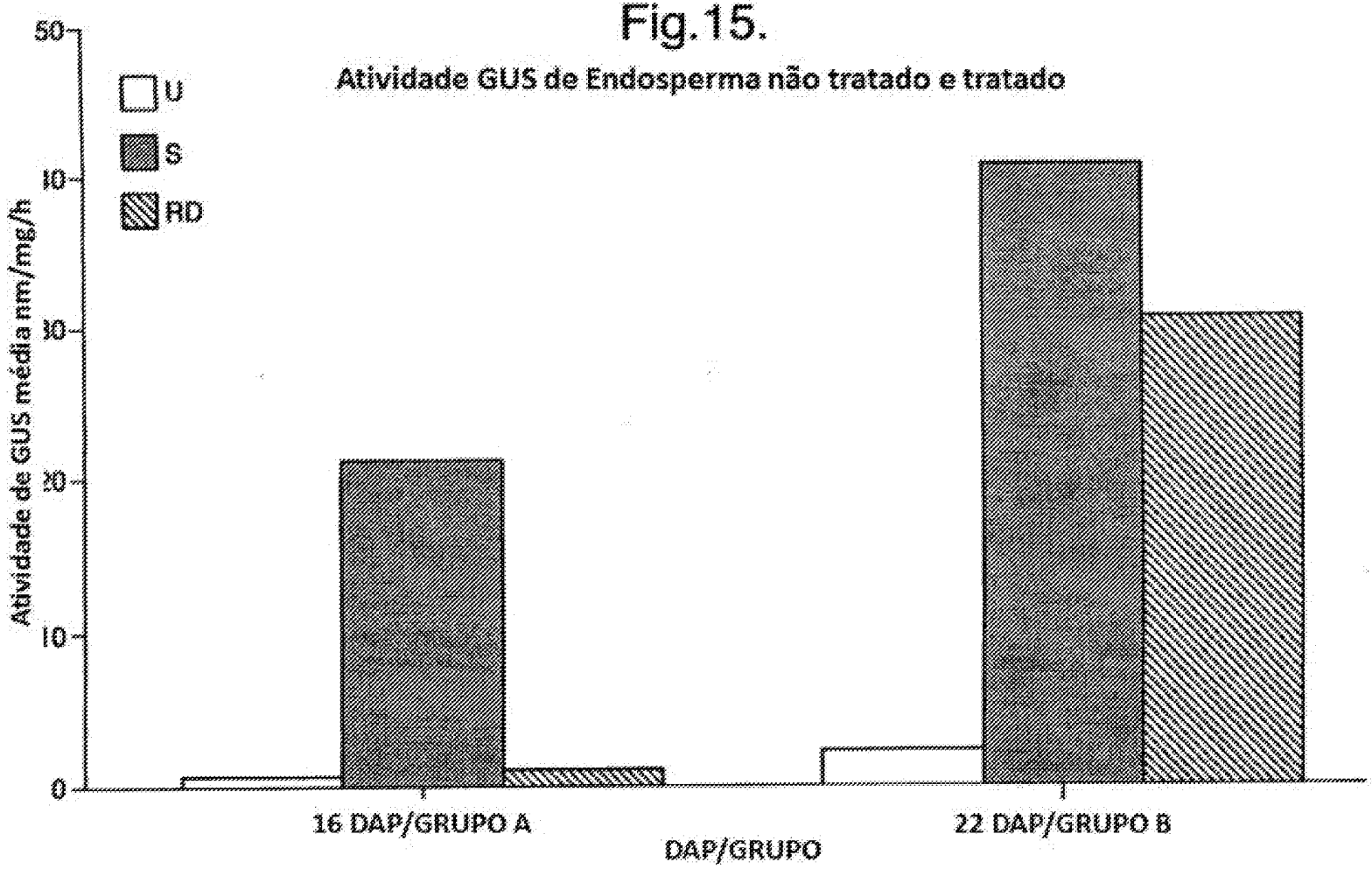

ug GST II-27/g Peso fresco
25
20
15
10
5
0
0.314
0.87
0.447
1.093
0.542
1.249
0.511
0.839
13.358
18.838
8F
Largo 2F
Meio 2F
Pequeno 2F
2X
Amostra do ensaio de campo
Repetição 1
Repetição 2

Fig.15.

Atividade GUS de Endosperma não tratado e tratado



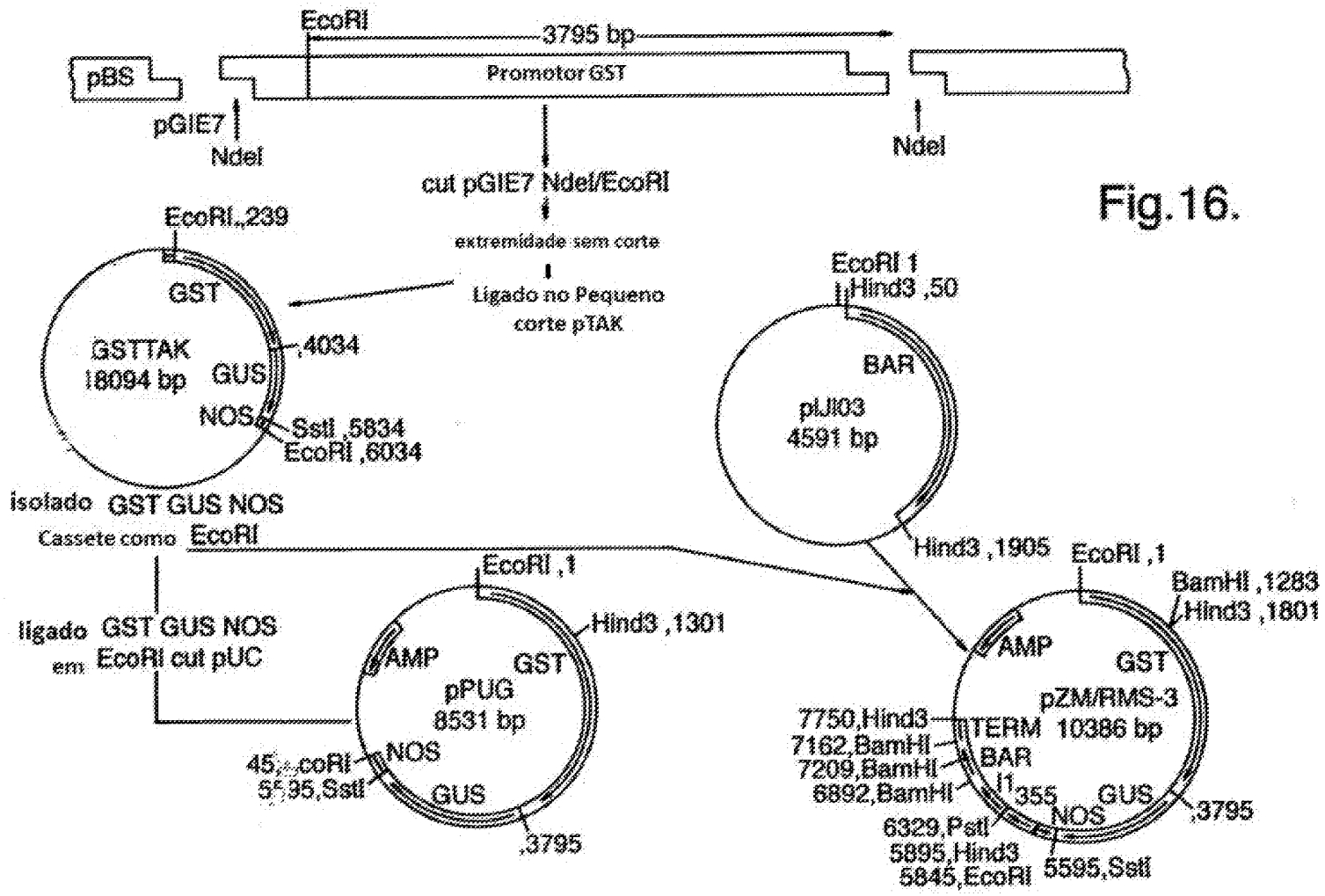

EcoRI
3795 bp
pBS
Promotor GST
pGIE7
NdeI
NdeI
cut pGIE7 NdeI/EcoRI
extremidade sem corte
Ligado no Pequeno corte pTAK
EcoRI,,239
GST
GSTTAK
18094 bp
GUS
,4034
NOS
SstI ,5834
EcoRI ,6034
isolado GST GUS NOS
Cassete como EcoRI
ligado GST GUS NOS
em EcoRI cut pUC
EcoRI 1
Hind3 ,50
BAR
pIJI03
4591 bp
Hind3 ,1905
EcoRI ,1
Hind3 ,1301
AMP
GST
pPUG
8531 bp
NOS
GUS
,3795
EcoRI ,1
BamHI ,1283
Hind3 ,1801
AMP
GST
pZM/RMS-3
10386 bp
7750,Hind3
TERM
7162,BamHI
BAR
7209,BamHI
6892,BamHI
355
GUS
,3795
NOS
6329,PstI
5895,Hind3
5845,EcoRI
5595,SstI

Fig.16.

Fig.17.

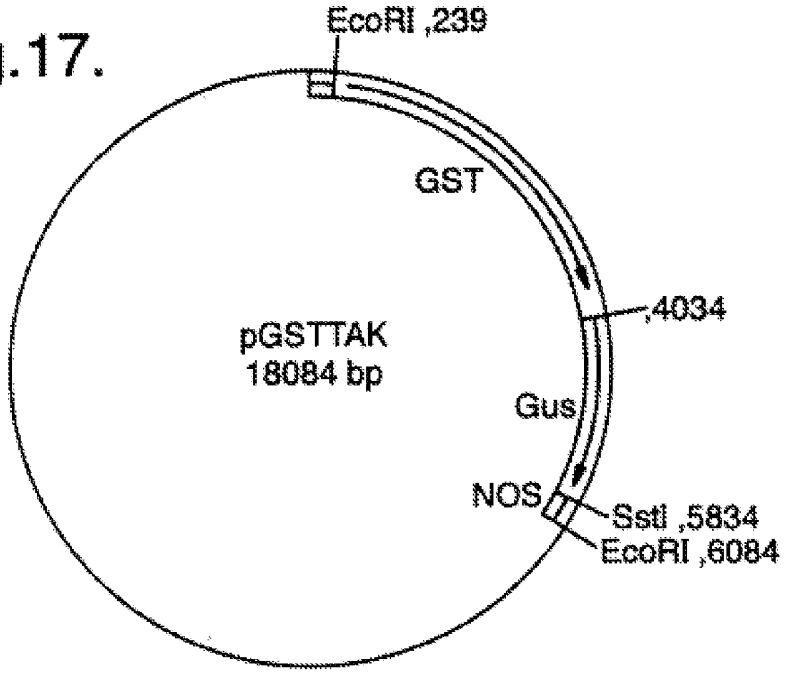

EcoRI ,239
GST
,4034
pGSTTAK
18084 bp
Gus
NOS
SstI ,5834
EcoRI ,6084

Fig.18.

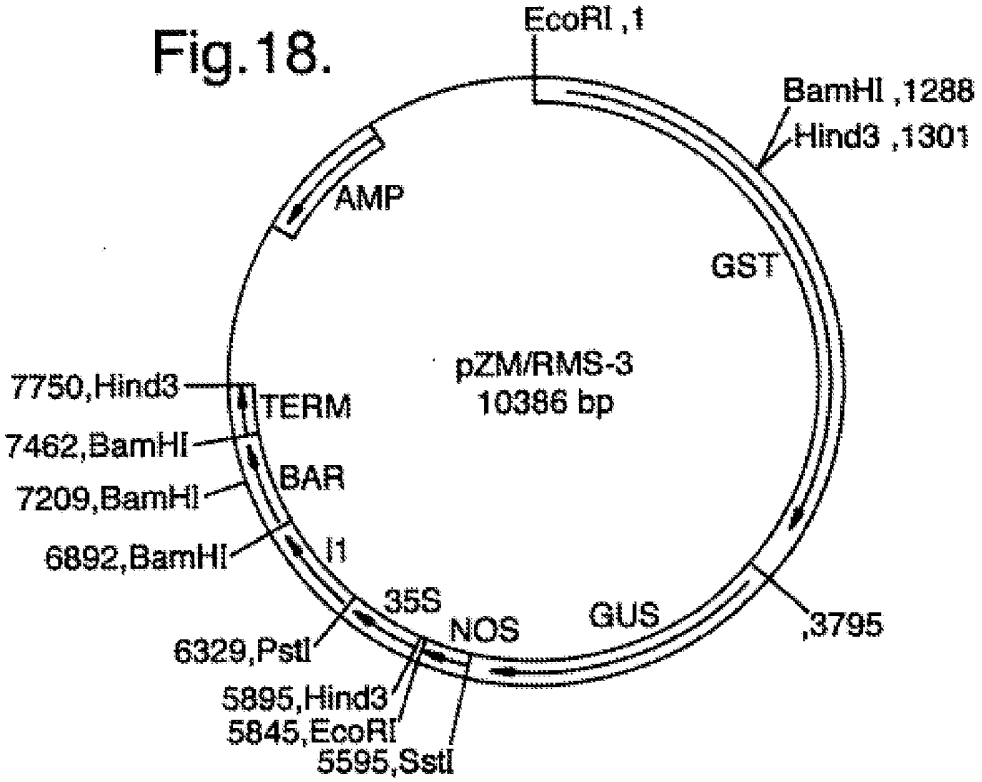

EcoRI ,1
BamHI ,1288
Hind3 ,1301
AMP
GST
pZM/RMS-3
10386 bp
7750,Hind3
TERM
7462,BamHI
BAR
7209,BamHI
6892,BamHI
I1
35S
NOS
GUS
,3795
6329,PstI
5895,Hind3
5845,EcoRI
5595,SstI

Fig.19.

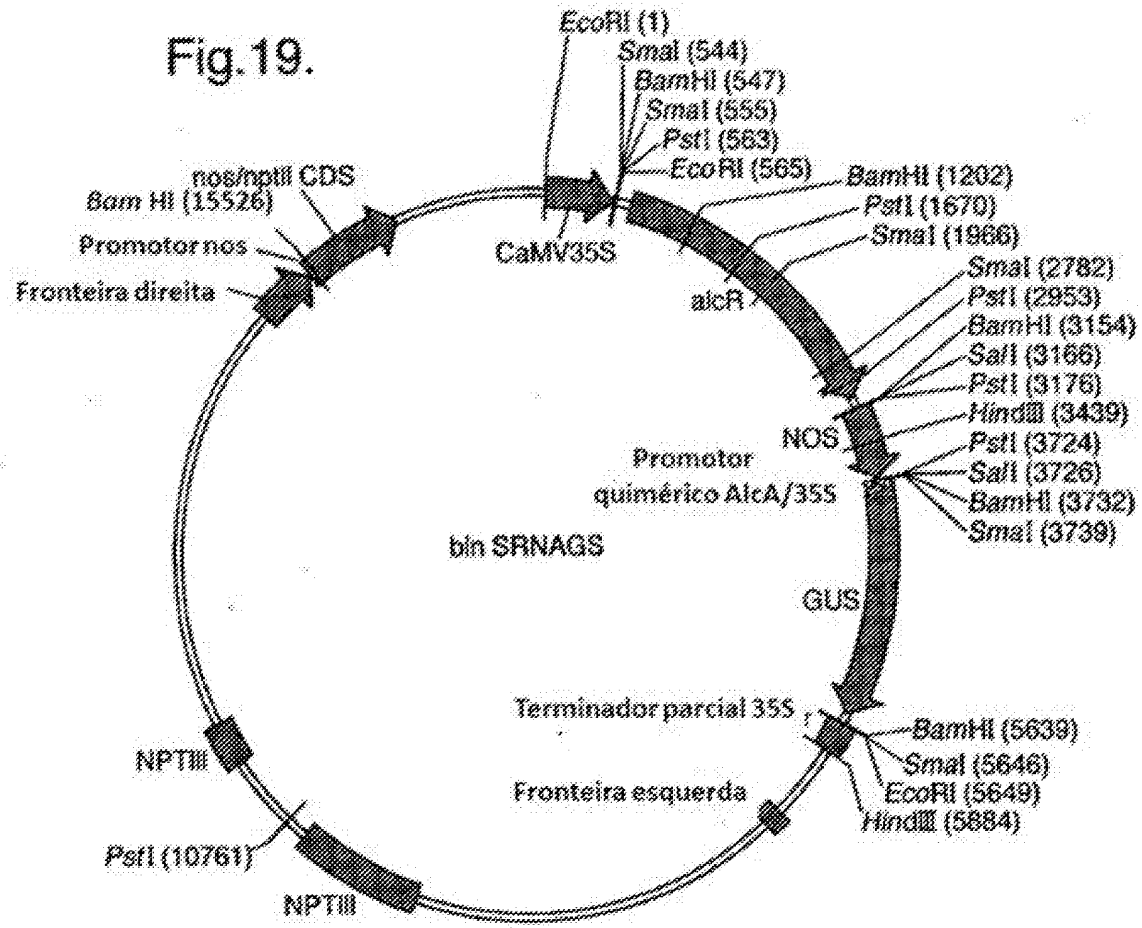

EcoRI (1)
SmaI (544)
BamHI (547)
SmaI (555)
PstI (563)
EcoRI (565)
BamHI (1202)
PstI (1670)
SmaI (1966)
SmaI (2782)
PstI (2953)
BamHI (3154)
SalI (3166)
PstI (3176)
HindIII (3439)
PstI (3724)
SalI (3726)
BamHI (3732)
SmaI (3739)
BamHI (5639)
SmaI (5646)
EcoRI (5649)
HindIII (5684)
nos/nptII CDS
Bam HI (15526)
Promotor nos
Fronteira direita
CaMV35S
alcR
NOS
Promotor
quimérico AlcA/35S
bin SRNAGS
GUS
Terminador parcial 35S
Fronteira esquerda
NPTIII
PstI (10761)
NPTIII

Fig.20.

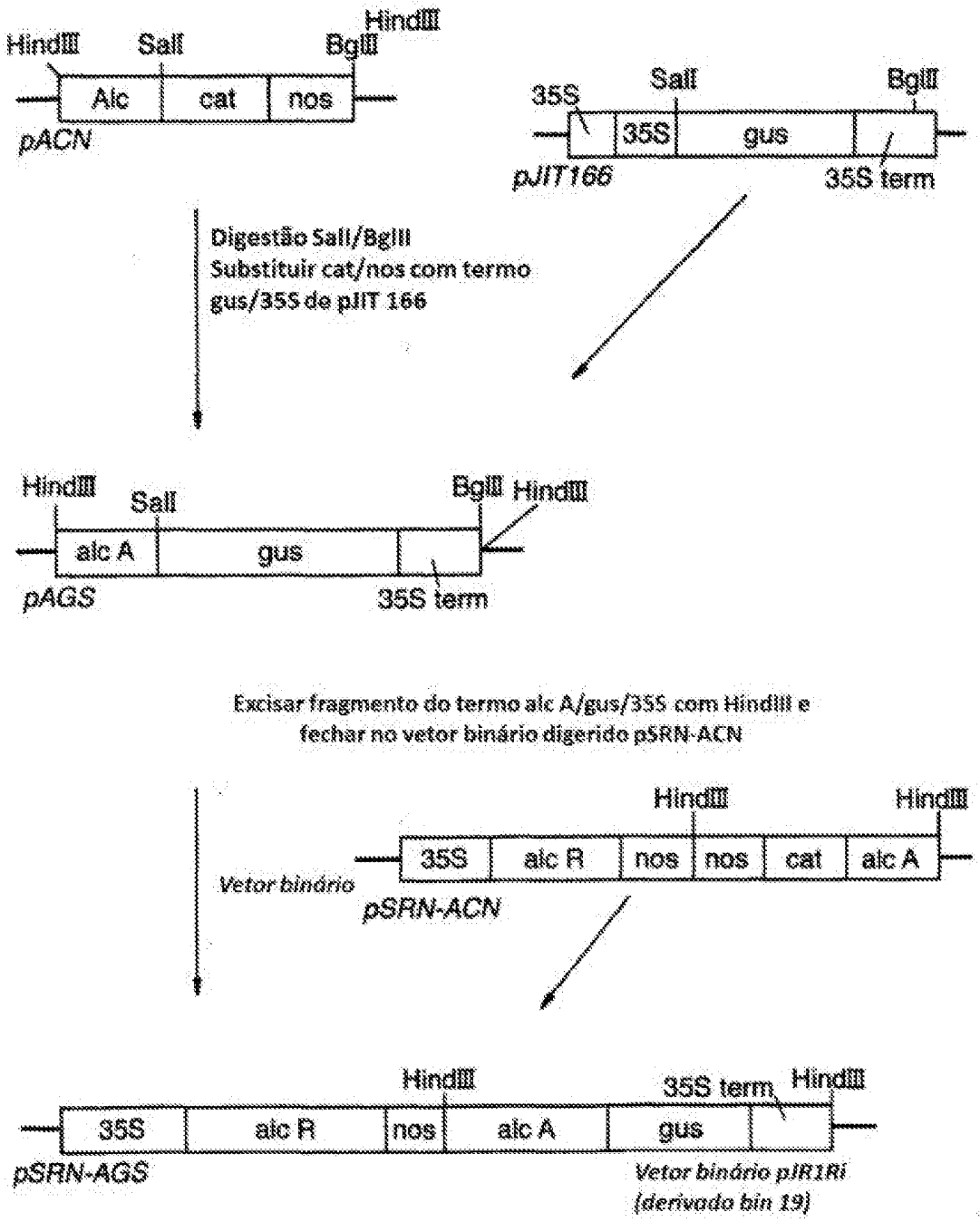

HindIII
SalI
BglII
HindIII
Alc
cat
nos
pACN
35S
SalI
BglII
35S
gus
pJIT166
35S term
Digestão SalI/BglII
Substituir cat/nos com termo
gus/35S de pJIT 166
HindIII
SalI
BglII
HindIII
alc A
gus
pAGS
35S term
Excisar fragmento do termo alc A/gus/35S com HindIII e
fechar no vetor binário digerido pSRN-ACN
HindIII
HindIII
Vetor binário
35S
alc R
nos
nos
cat
alc A
pSRN-ACN
HindIII
35S term
HindIII
35S
alc R
nos
alc A
gus
pSRN-AGS
Vetor binário pIR1Ri
(derivado bin 19)

Fig.21.

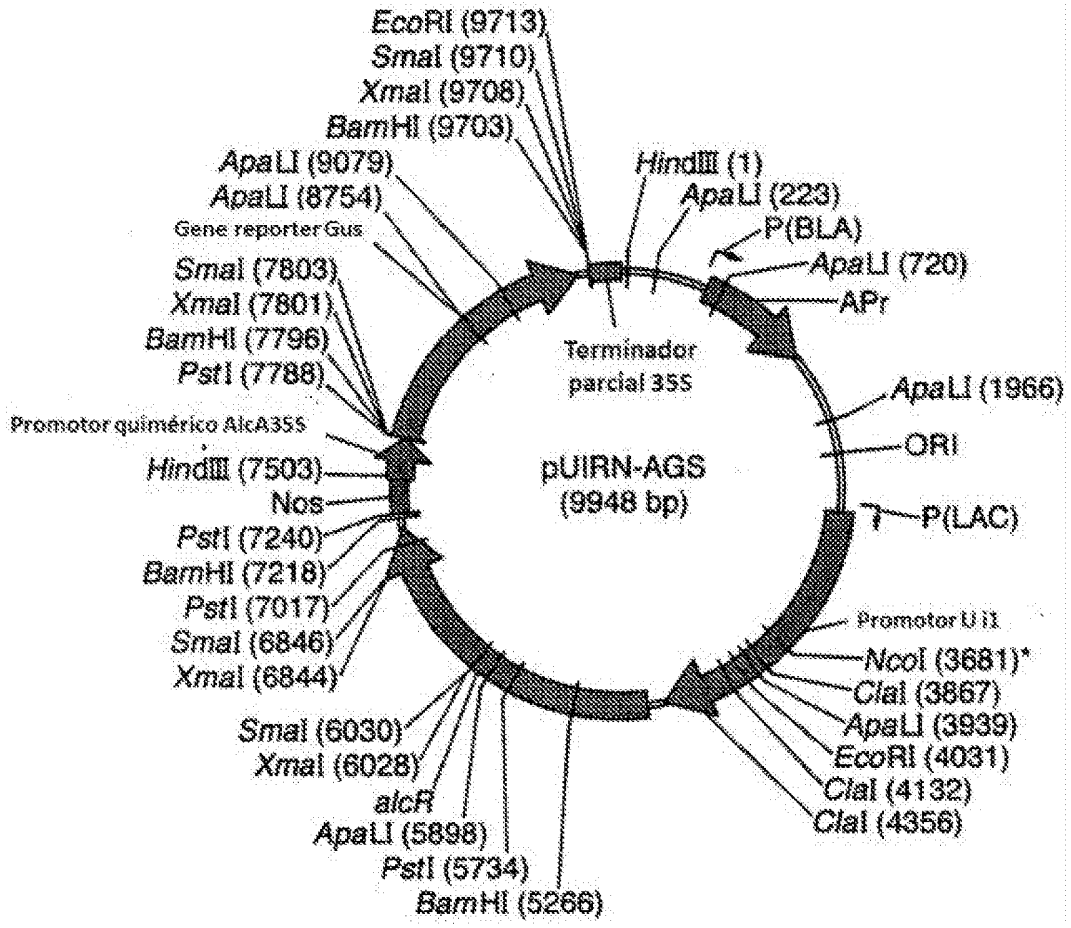

EcoRI (9713)
SmaI (9710)
XmaI (9708)
BamHI (9703)
ApaLI (9079)
ApaLI (8754)
Gene reporter Gus
SmaI (7803)
XmaI (7801)
BamHI (7796)
PstI (7788)
Promotor quimérico AlcA35S
HindIII (7503)
Nos
PstI (7240)
BamHI (7218)
PstI (7017)
SmaI (6846)
XmaI (6844)
SmaI (6030)
XmaI (6028)
alcR
ApaLI (5898)
PstI (5734)
BamHI (5266)
HindIII (1)
ApaLI (223)
P(BLA)
ApaLI (720)
APr
Terminador
parcial 35S
ApaLI (1966)
ORI
pUIRN-AGS
(9948 bp)
P(LAC)
Promotor U i1
NcoI (3681)*
ClaI (3867)
ApaLI (3939)
EcoRI (4031)
ClaI (4132)
ClaI (4356)

Fig.22.

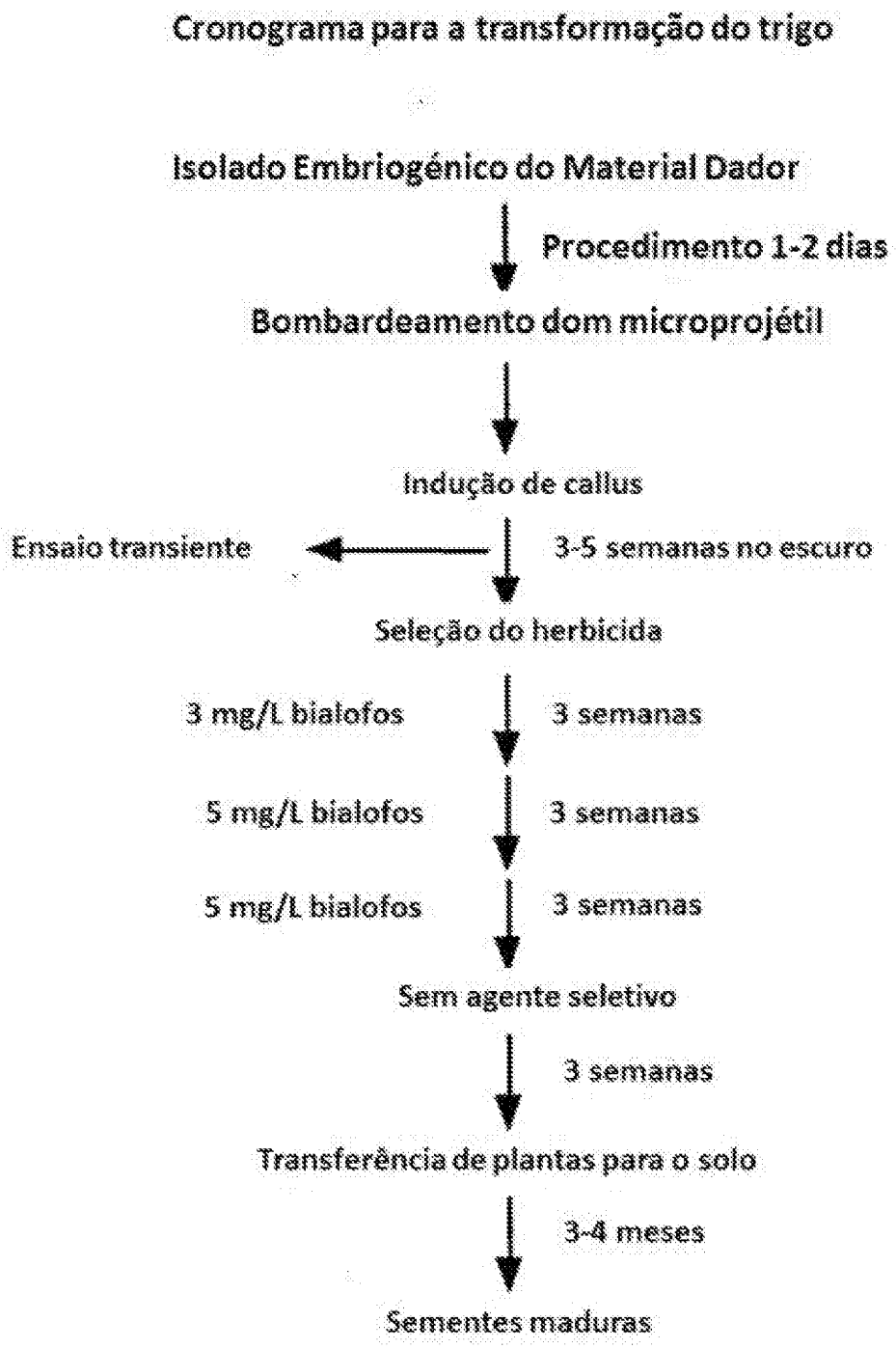

Cronograma para a transformação do trigo
Isolado Embriogénico do Material Dador
Procedimento 1-2 dias
Bombardeamento dom microprojétil
Indução de callus
Ensaio transiente
3-5 semanas no escuro
Seleção do herbicida
3 mg/L bialofos
3 semanas
5 mg/L bialofos
3 semanas
5 mg/L bialofos
3 semanas
Sem agente seletivo
3 semanas
Transferência de plantas para o solo
3-4 meses
Sementes maduras

Fig.23.

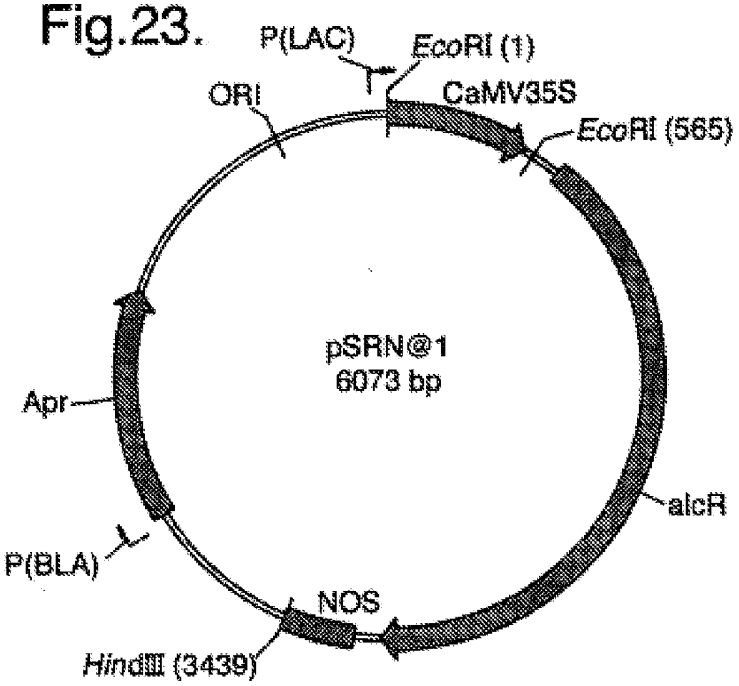

P(LAC)
EcoRI (1)
ORI
CaMV35S
EcoRI (565)
pSRN@1
6073 bp
Apr
alcR
P(BLA)
NOS
HindIII (3439)

Fig.24.

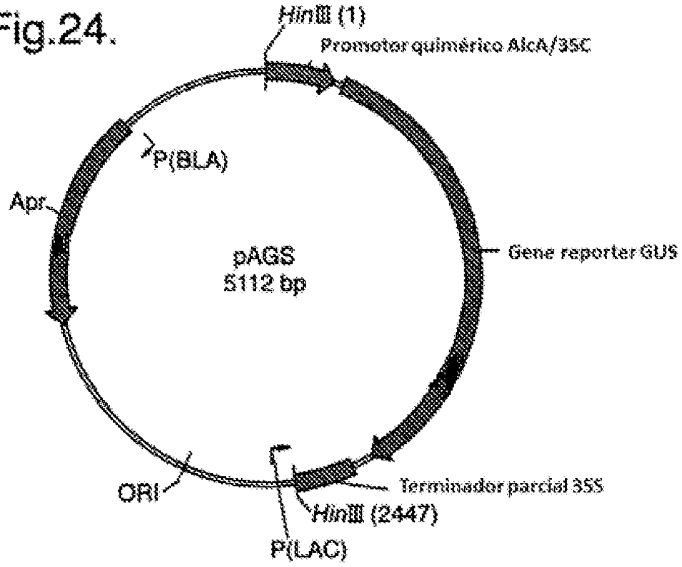

HinIII (1)
Promotor quimérico AlcA/35C
P(BLA)
Apr
pAGS
5112 bp
Gene reporter GUS
ORI
Terminador parcial 35S
HinIII (2447)
P(LAC)

Fig.25.

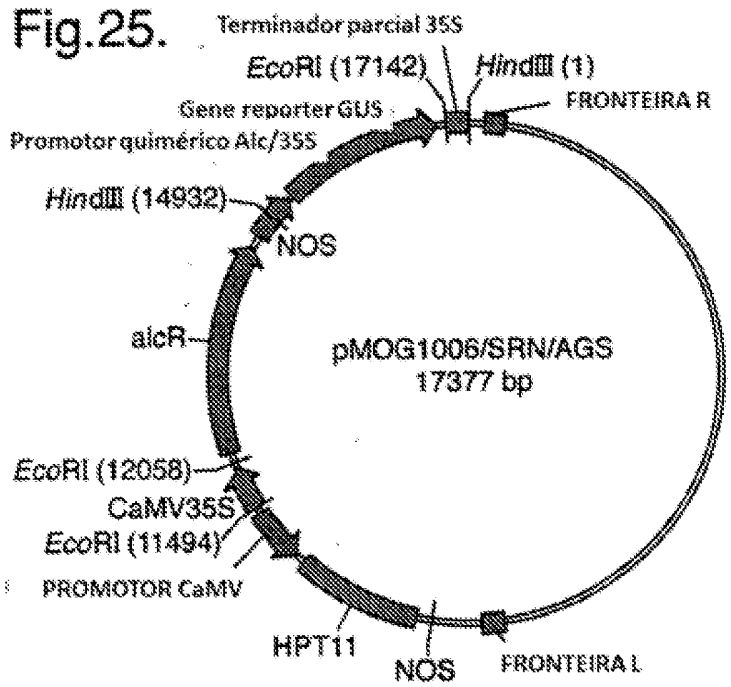

Terminador parcial 35S
EcoRI (17142)
HindIII (1)
FRONTEIRA R
Gene reporter GUS
Promotor quimérico Alc/35S
HindIII (14932)
NOS
alcR
pMOG1006/SRN/AGS
17377 bp
EcoRI (12058)
CaMV35S
EcoRI (11494)
PROMOTOR CaMV
HPT11
NOS
FRONTEIRA L

Fig.26.

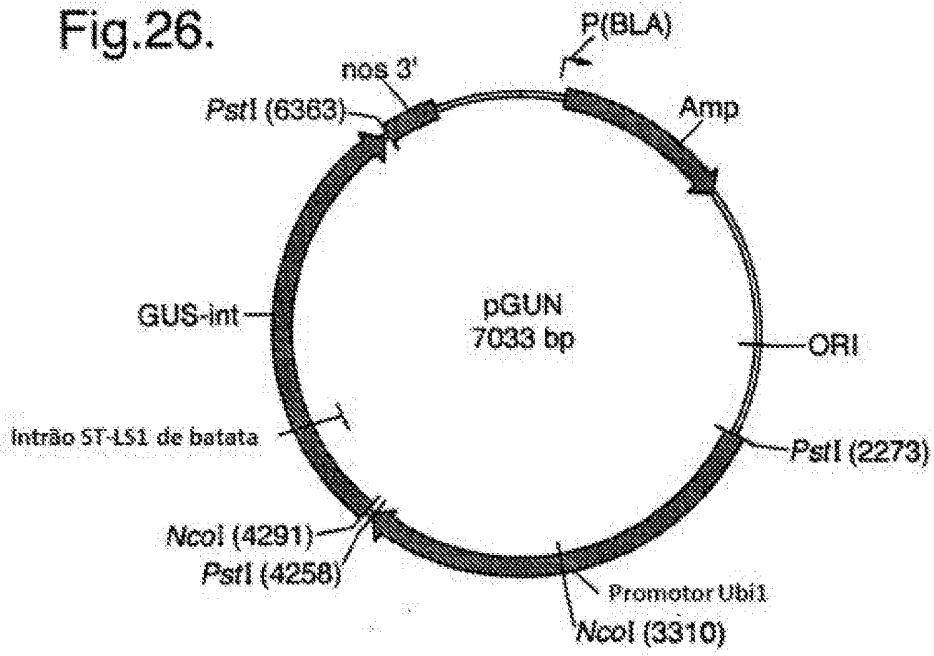

P(BLA)
nos 3'
PstI (6363)
Amp
GUS-int
pGUN
7033 bp
ORI
Intrão ST-LS1 de batata
PstI (2273)
NcoI (4291)
PstI (4258)
Promotor Ubi1
NcoI (3310)

Fig.27.

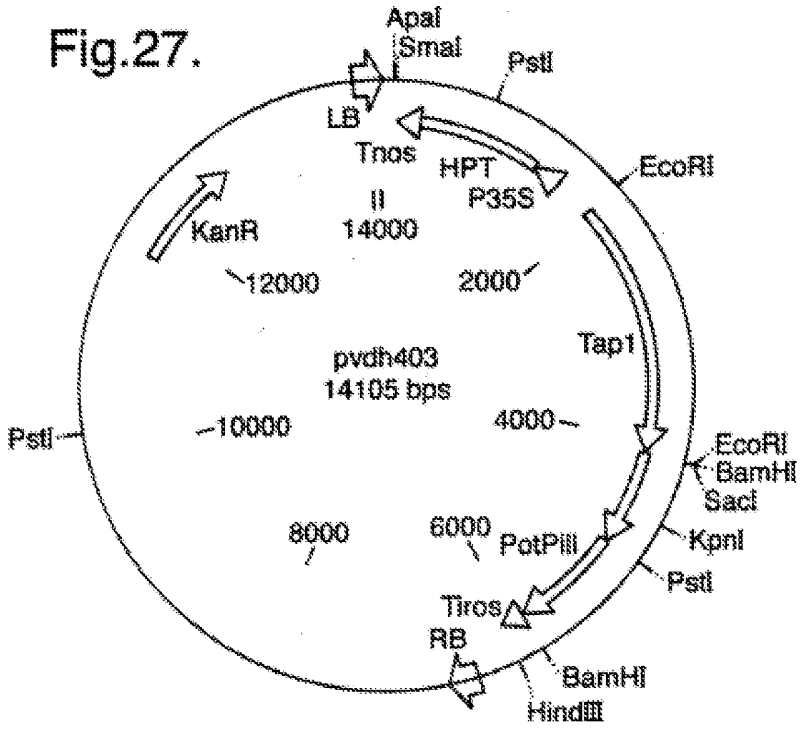

ApaI
SmaI
PstI
LB
Tnos
HPT
P35S
EcoRI
II
14000
KanR
12000
2000
Tap1
pvdh403
14105 bps
PstI
10000
4000
EcoRI
BamHI
SacI
8000
6000
PotPIII
KpnI
PstI
Tiros
RB
BamHI
HindIII

Fig.28.

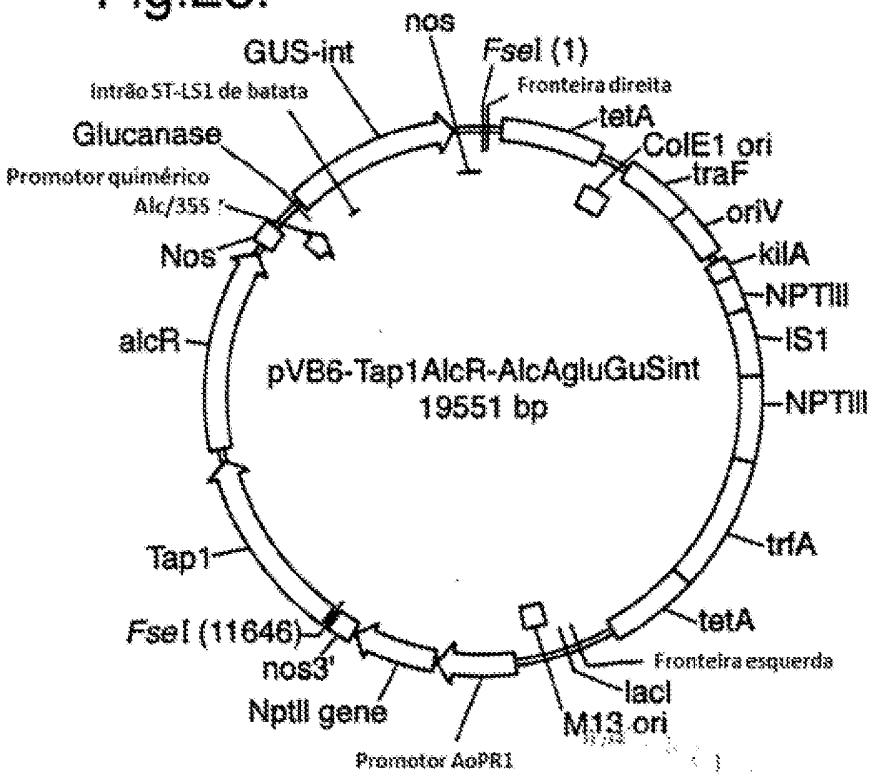

nos
GUS-int
FseI (1)
Intrão ST-LS1 de batata
Fronteira direita
tetA
Glucanase
ColE1 ori
Promotor quimérico
Alc/35S
traF
oriV
Nos
kilA
NPTIII
alcR
IS1
pVB6-Tap1AlcR-AlcAgluGuSint
19551 bp
NPTIII
trfA
Tap1
tetA
FseI (11646)
nos3'
Fronteira esquerda
lacI
NptII gene
M13 ori
Promotor AoPR1

Fig.29.

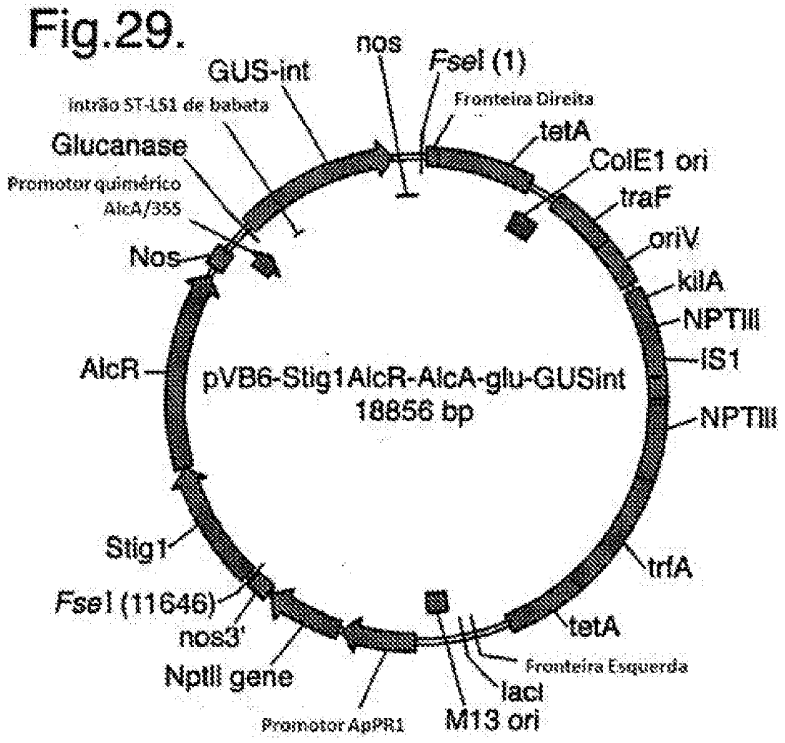
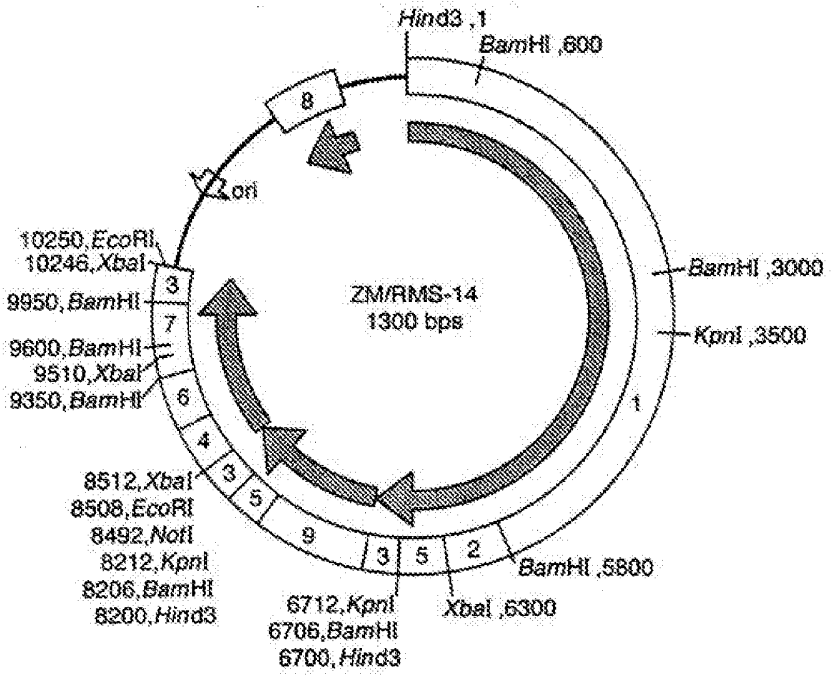


Fig.30.



CHAVES PARA GENES

1 = Promotor MFS[14] (fragmento 5,8 kb)
2 = barnase
3 = nos poli A
4 = promotor CaMV 35S
5 = barstar
6 = intrão Adh 1
7 = bar
8 = resistência a ampicilina
9 = GST II-27 prom. 0,9 kb

Fig.31.

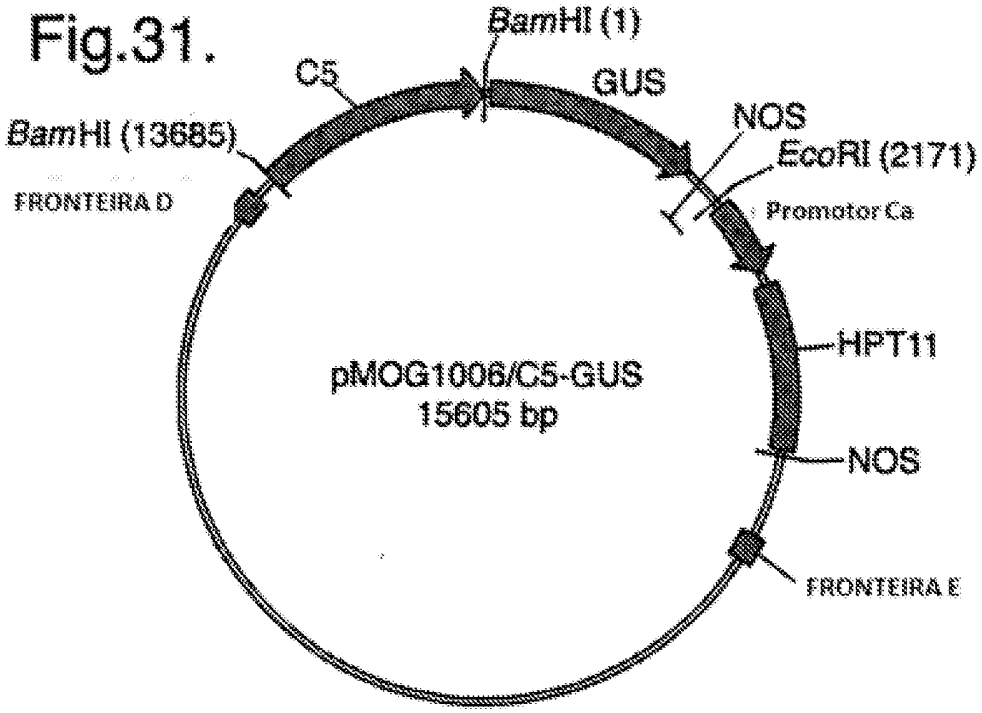

BamHI (1)
C5
GUS
NOS
BamHI (13685)
EcoRI (2171)
FRONTEIRA D
Promotor Ca
HPT11
pMOG1006/C5-GUS
15605 bp
NOS
FRONTEIRA E

Fig.32.

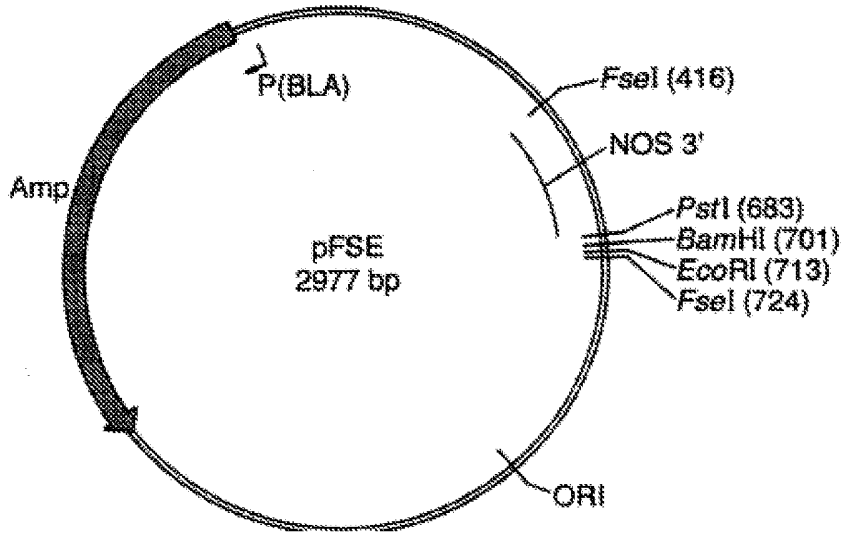

P(BLA)
FseI (416)
NOS 3'
Amp
PstI (683)
BamHI (701)
EcoRI (713)
FseI (724)
pFSE
2977 bp
ORI

Fig.33.

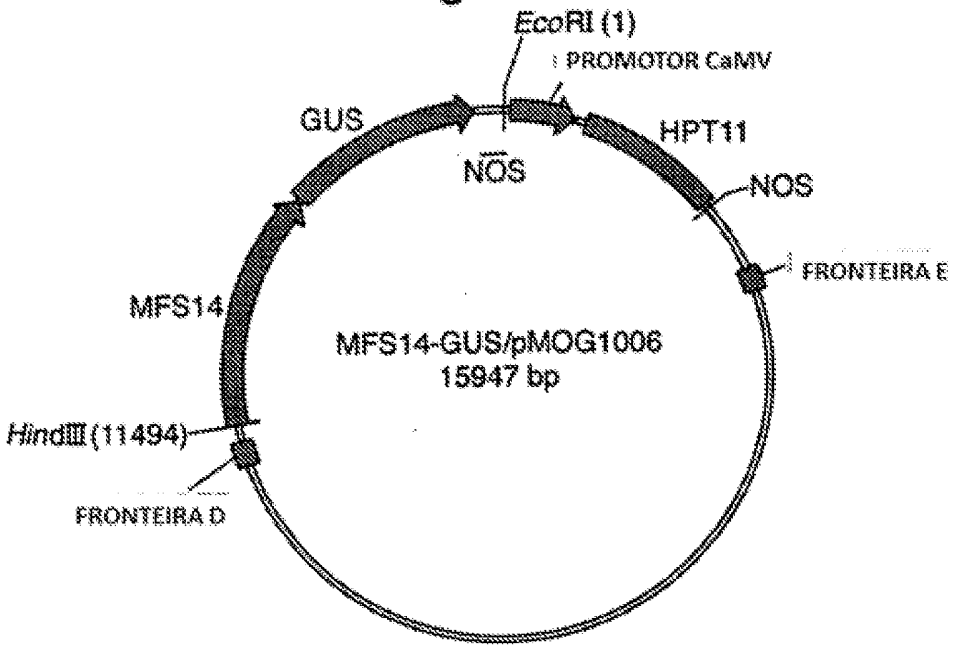

EcoRI (1)
PROMOTOR CaMV
GUS
HPT11
NOS
NOS
FRONTEIRA E
MFS14
MFS14-GUS/pMOG1006
15947 bp
HindIII (11494)
FRONTEIRA D

Fig.34.

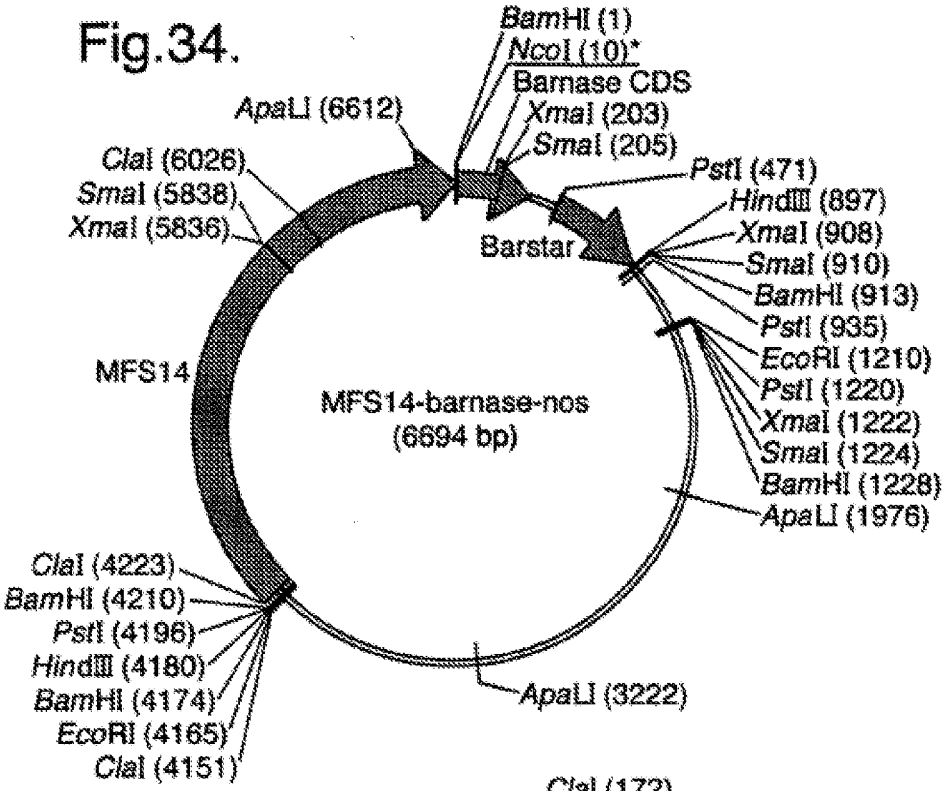

BamHI (1)
NcoI (10)*
Barnase CDS
XmaI (203)
SmaI (205)
ApaLI (6612)
ClaI (6026)
SmaI (5838)
XmaI (5836)
PstI (471)
HindIII (897)
XmaI (908)
SmaI (910)
BamHI (913)
PstI (935)
EcoRI (1210)
PstI (1220)
XmaI (1222)
SmaI (1224)
BamHI (1228)
ApaLI (1976)
Barstar
MFS14
MFS14-barnase-nos
(6694 bp)
ClaI (4223)
BamHI (4210)
PstI (4196)
HindIII (4180)
BamHI (4174)
EcoRI (4165)
ClaI (4151)
ApaLI (3222)

Fig.35.

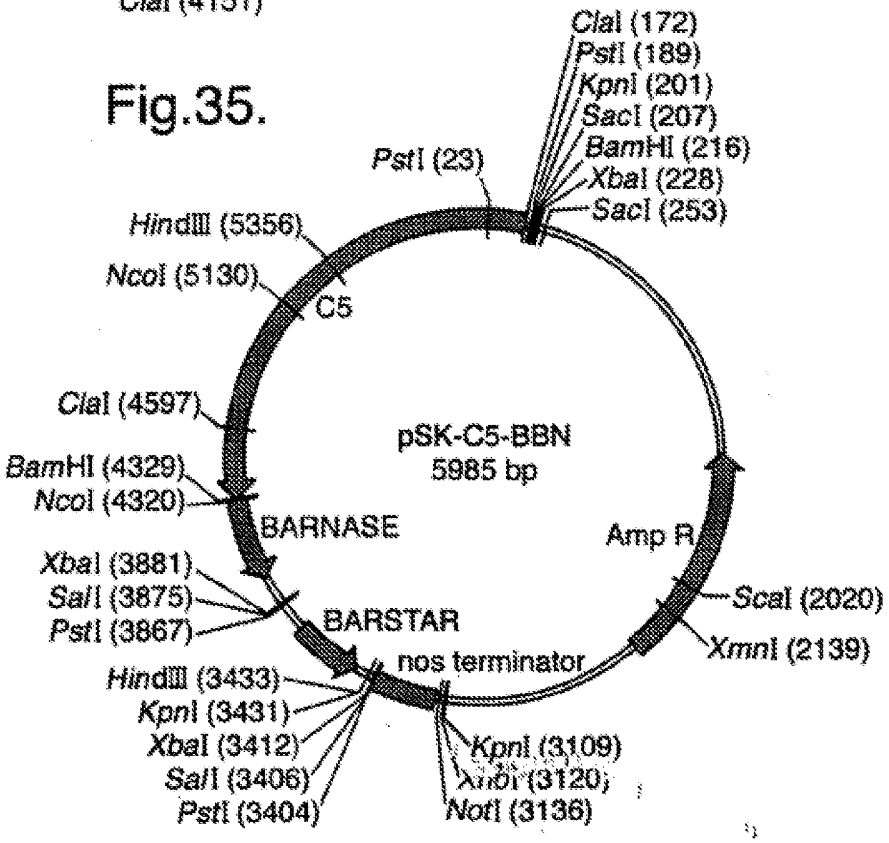

ClaI (172)
PstI (189)
KpnI (201)
SacI (207)
BamHI (216)
XbaI (228)
SacI (253)
PstI (23)
HindIII (5356)
NcoI (5130)
C5
ClaI (4597)
BamHI (4329)
NcoI (4320)
pSK-C5-BBN
5985 bp
BARNASE
Amp R
XbaI (3881)
SalI (3875)
PstI (3867)
BARSTAR
ScaI (2020)
XmnI (2139)
nos terminator
HindIII (3433)
KpnI (3431)
XbaI (3412)
SalI (3406)
PstI (3404)
KpnI (3109)
XmaI (3120)
NotI (3136)

Fig.36.

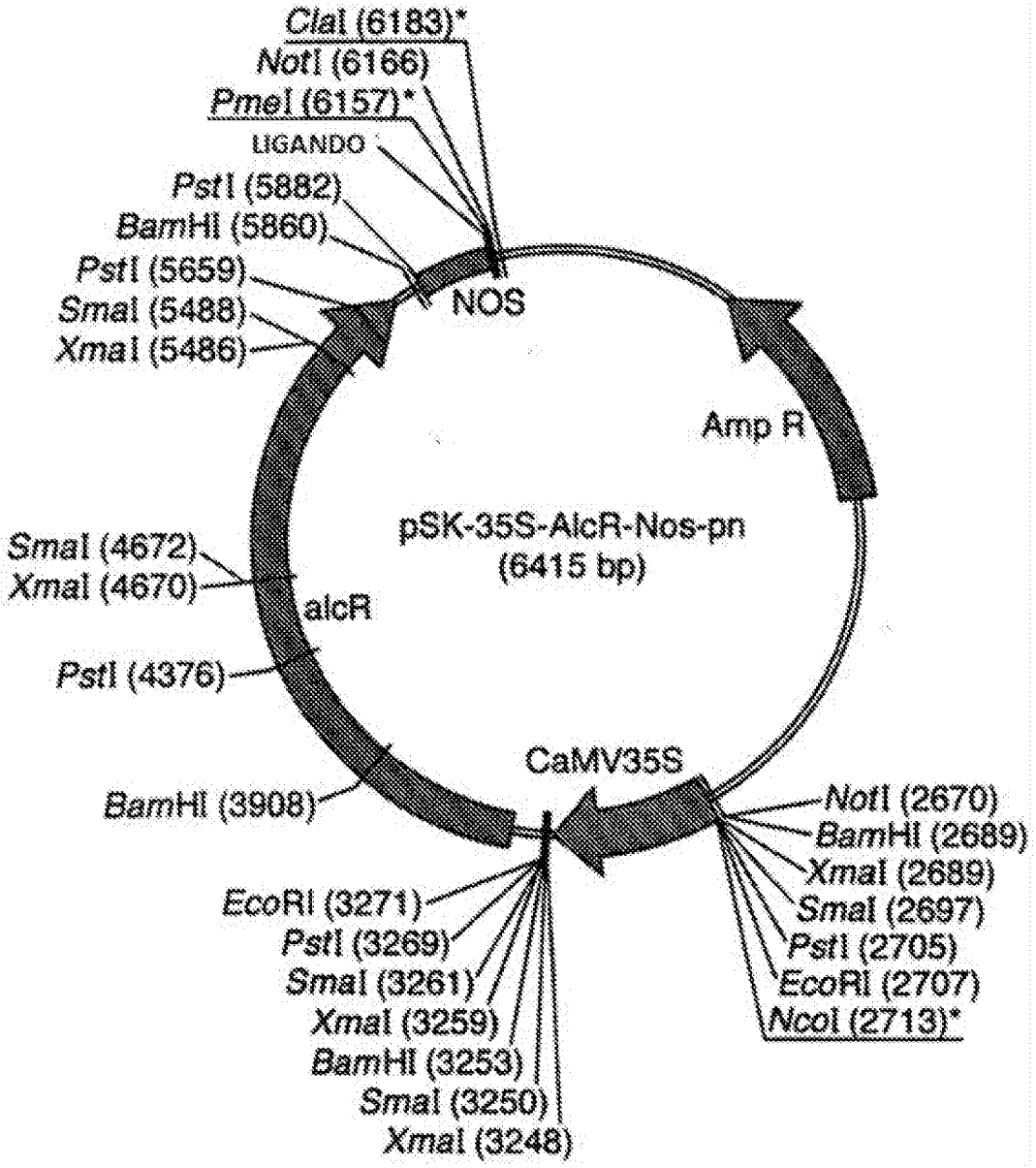

ClaI (6183)*
NotI (6166)
PmeI (6157)*
LIGANDO
PstI (5882)
BamHI (5860)
PstI (5659)
SmaI (5488)
XmaI (5486)
NOS
Amp R
pSK-35S-AlcR-Nos-pn
(6415 bp)
SmaI (4672)
XmaI (4670)
alcR
PstI (4376)
CaMV35S
BamHI (3908)
NotI (2670)
BamHI (2689)
XmaI (2689)
SmaI (2697)
PstI (2705)
EcoRI (2707)
NcoI (2713)*
EcoRI (3271)
PstI (3269)
SmaI (3261)
XmaI (3259)
BamHI (3253)
SmaI (3250)
XmaI (3248)

Fig.37.

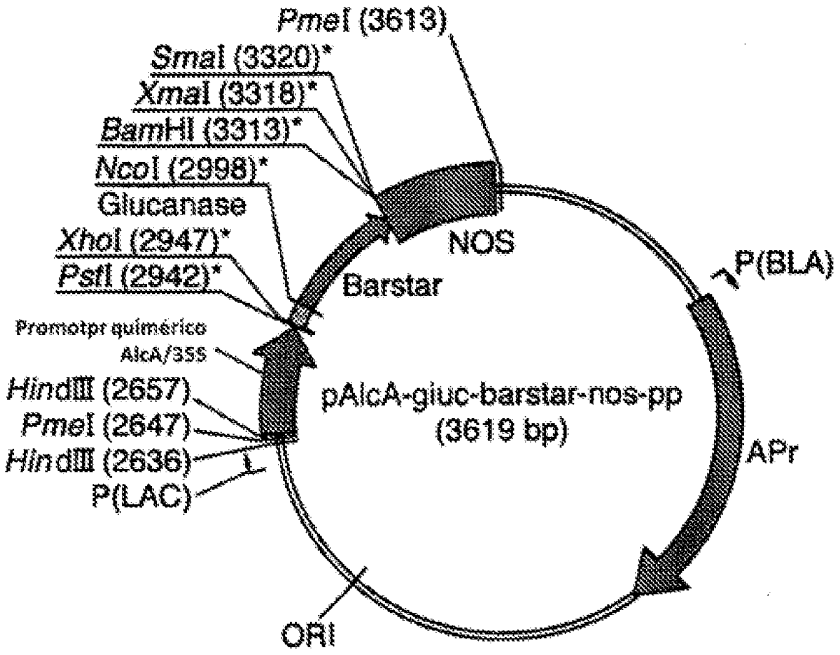

PmeI (3613)
SmaI (3320)*
XmaI (3318)*
BamHI (3313)*
NcoI (2998)*
Glucanase
XhoI (2947)*
PstI (2942)*
Promotpr quimérico
AlcA/35S
HindIII (2657)
PmeI (2647)
HindIII (2636)
P(LAC)
NOS
Barstar
P(BLA)
pAlcA-giuc-barstar-nos-pp
(3619 bp)
APr
ORI

Fig.38.

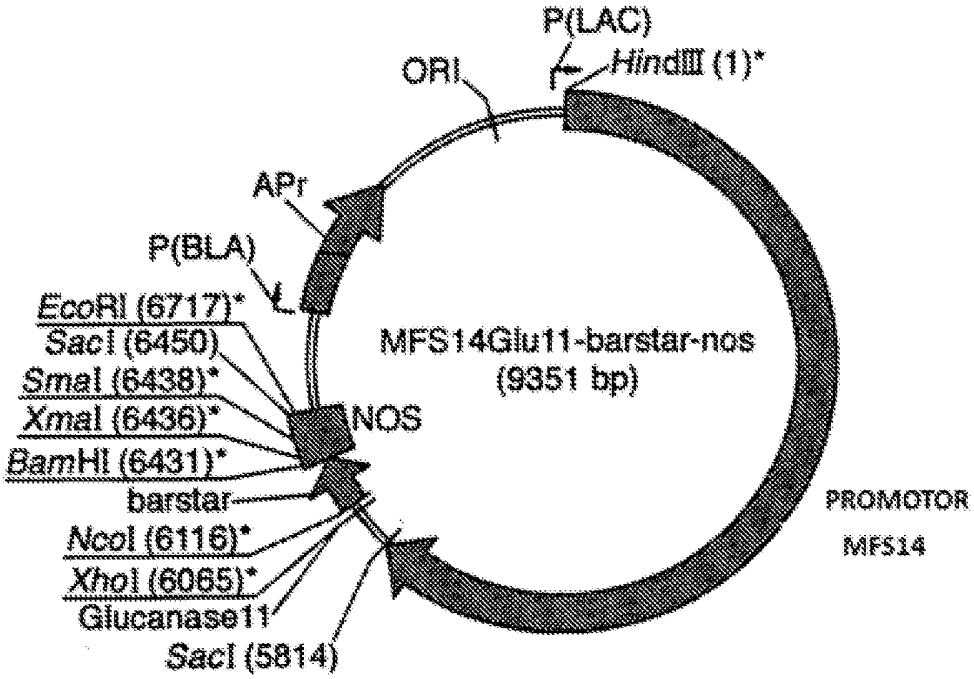

P(LAC)
HindIII (1)*
ORI
APr
P(BLA)
EcoRI (6717)*
SacI (6450)
SmaI (6438)*
XmaI (6436)*
BamHI (6431)*
barstar
NcoI (6116)*
XhoI (6065)*
Glucanase11
SacI (5814)
NOS
MFS14Glu11-barstar-nos
(9351 bp)
PROMOTOR
MF514

Fig.39.

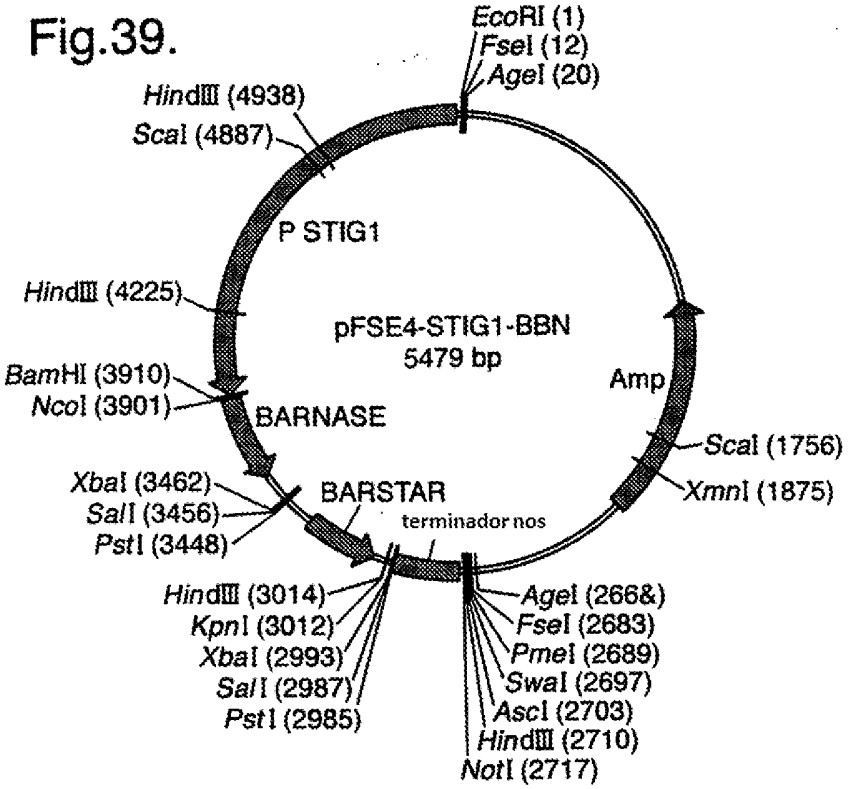

EcoRI (1)
FseI (12)
AgeI (20)
HindIII (4938)
ScaI (4887)
P STIG1
HindIII (4225)
pFSE4-STIG1-BBN
5479 bp
BamHI (3910)
NcoI (3901)
BARNASE
Amp
ScaI (1756)
XmnI (1875)
XbaI (3462)
SalI (3456)
PstI (3448)
BARSTAR
terminador nos
HindIII (3014)
KpnI (3012)
XbaI (2993)
SalI (2987)
PstI (2985)
AgeI (266&)
FseI (2683)
PmeI (2689)
SwaI (2697)
AscI (2703)
HindIII (2710)
NotI (2717)

Fig.40.

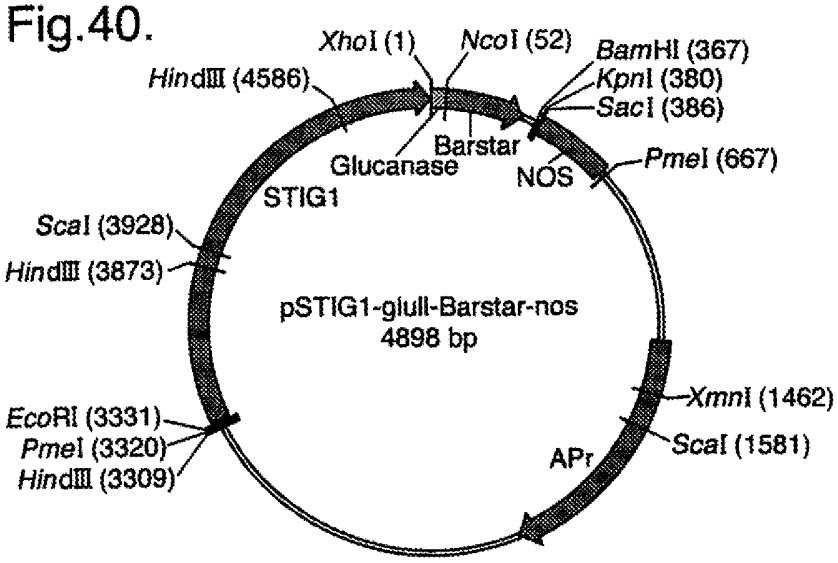

XhoI (1)
NcoI (52)
BamHI (367)
KpnI (380)
SacI (386)
HindIII (4586)
Barstar
Glucanase
NOS
PmeI (667)
STIG1
ScaI (3928)
HindIII (3873)
pSTIG1-gluII-Barstar-nos
4898 bp
XmnI (1462)
EcoRI (3331)
PmeI (3320)
HindIII (3309)
APr
ScaI (1581)

Fig.41.

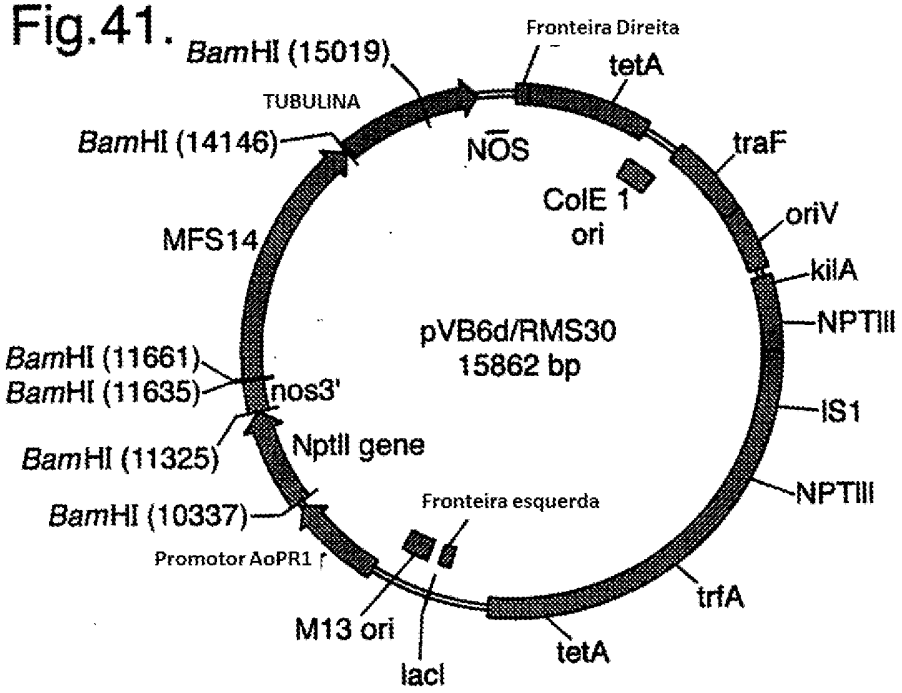

BamHI (15019)
Fronteira Direita
tetA
TUBULINA
BamHI (14146)
NOS
traF
ColE 1
ori
oriV
MFS14
kilA
NPTIII
pVB6d/RMS30
15862 bp
BamHI (11661)
BamHI (11635)
nos3'
IS1
BamHI (11325)
NptII gene
NPTIII
BamHI (10337)
Fronteira esquerda
Promotor AoPR1
trfA
M13 ori
tetA
lacI

Fig.42.

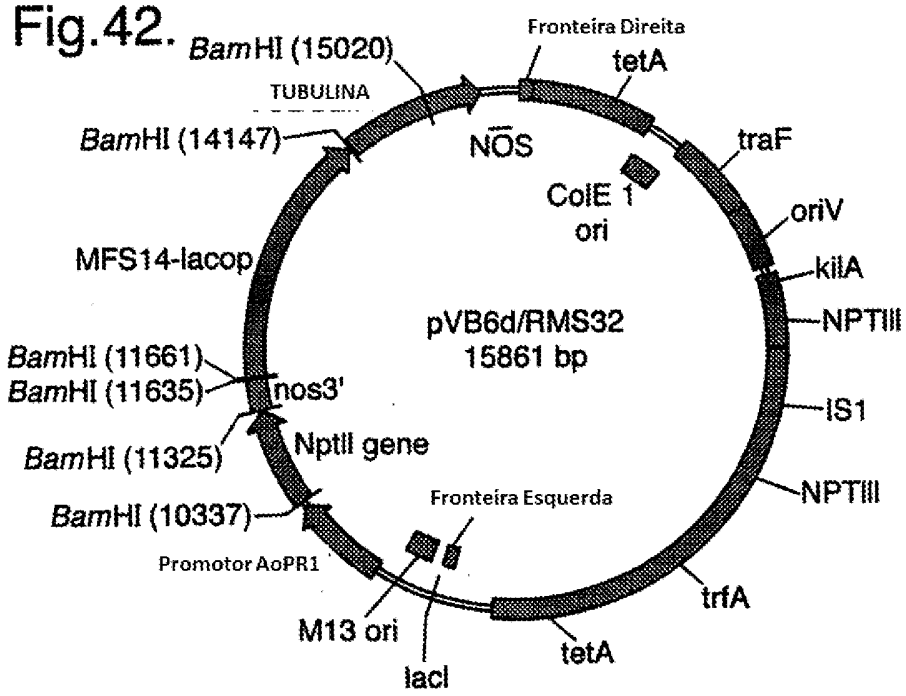

BamHI (15020)
Fronteira Direita
tetA
TUBULINA
BamHI (14147)
NOS
traF
ColE 1
ori
oriV
MFS14-lacop
kilA
NPTIII
pVB6d/RMS32
15861 bp
BamHI (11661)
BamHI (11635)
nos3'
IS1
BamHI (11325)
NptII gene
NPTIII
BamHI (10337)
Fronteira Esquerda
Promotor AoPR1
trfA
M13 ori
tetA
lacI

Fig.43.

Experiência para testar o vazamento e inducibilidade do promotor AlcA em callus de tabaco transgénico

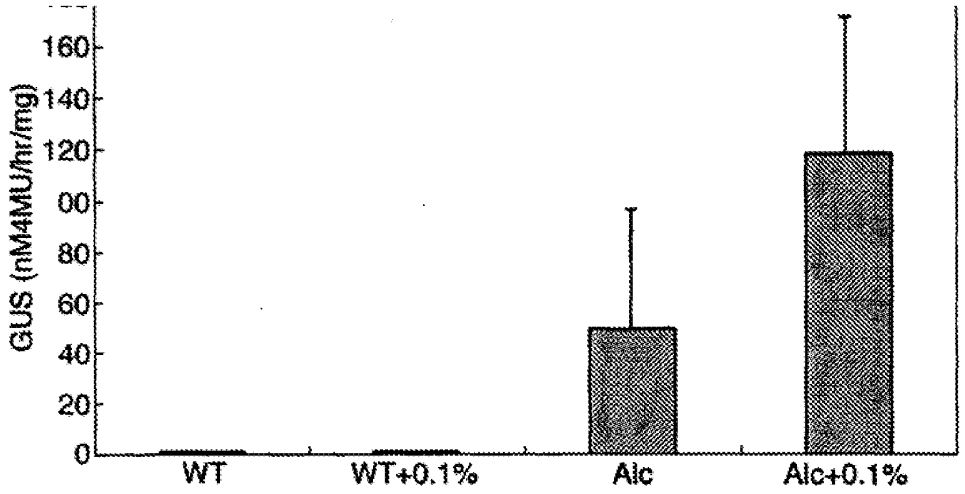


Fig.44.

Análise GUS de anteras a partir de plantas de tabaco induzidas e não induzidas

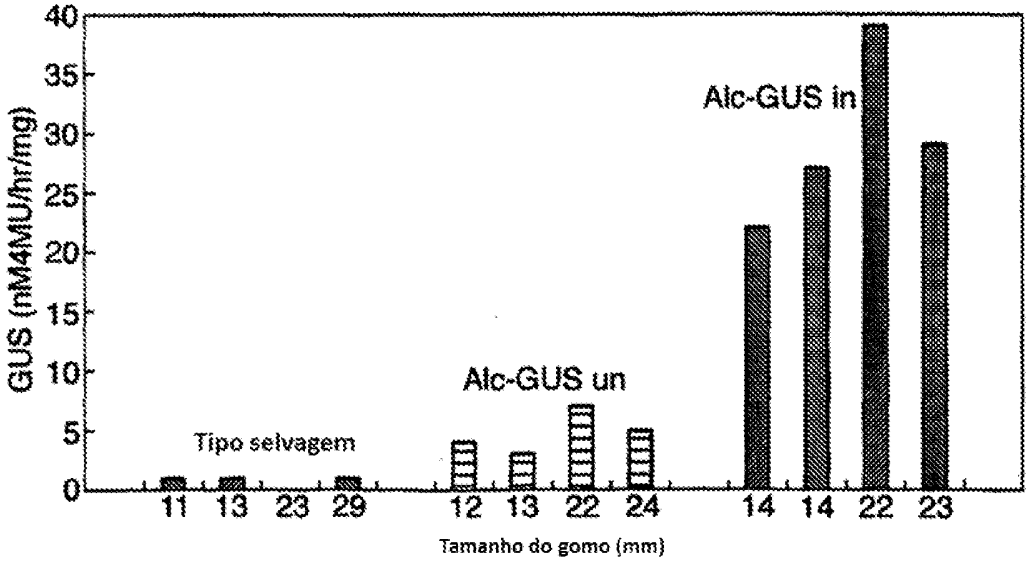


Fig.45.

Análise GUS de anteras a partir de hastes de tabaco tratadas com água e etanol

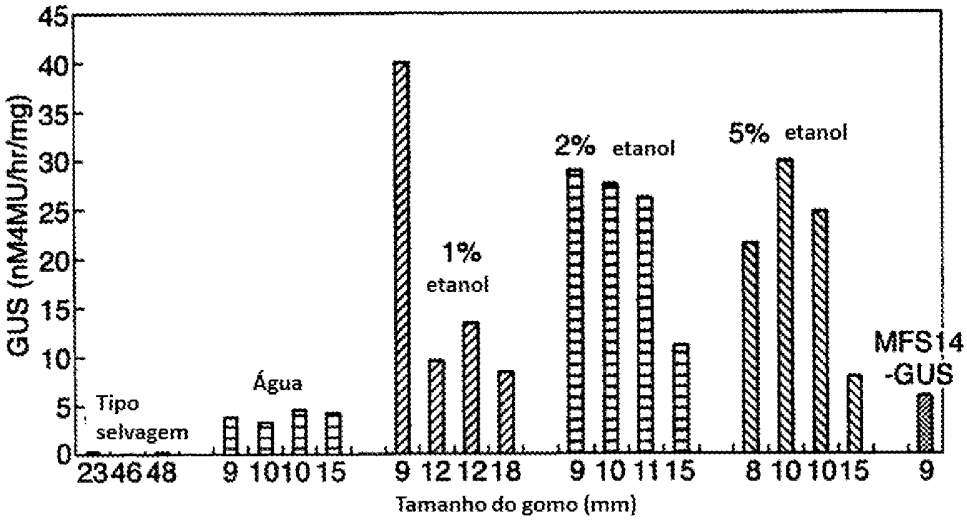
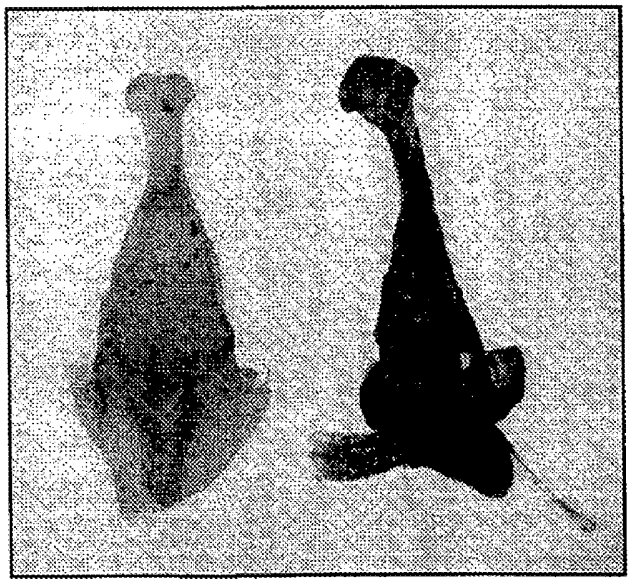


Fig.46.

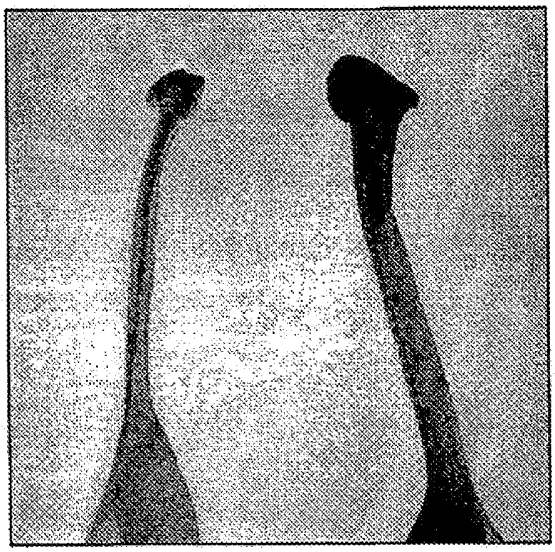


Tratado com água

Tratado com 5% etanol

Gomos de tabaco 9mm

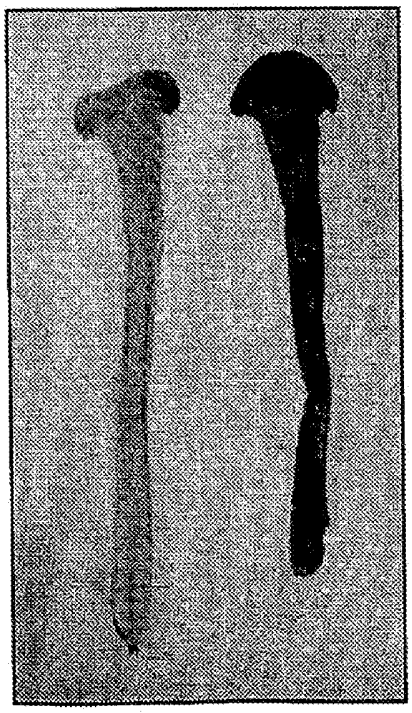
Fig.47.



Tratado com água | Tratado com 5% etanol

Gomos de tabaco 17-22 mm

Fig.48.



Tratado com água | Tratado com 5% etanol

Gomos de tabaco 33-35 mm

Fig.49.

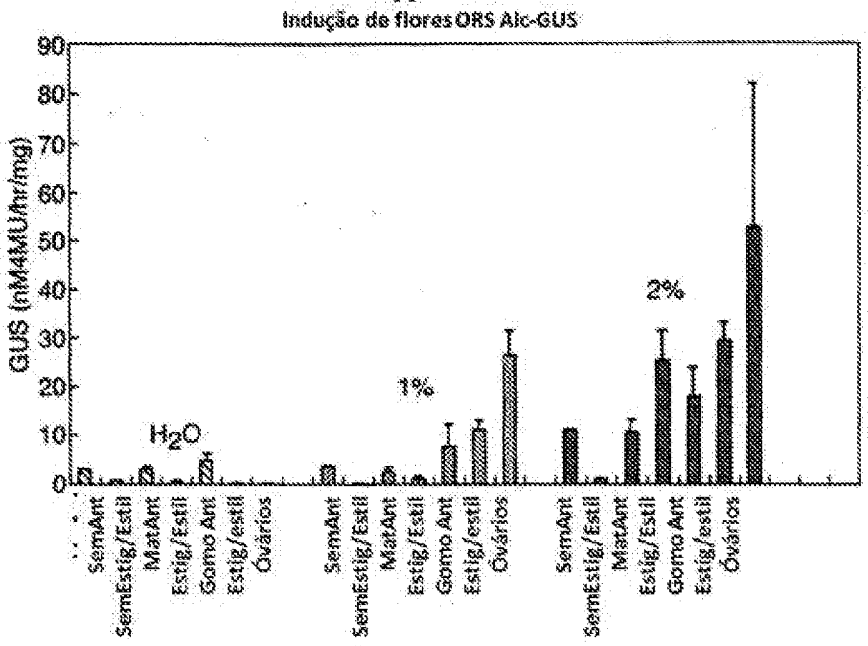
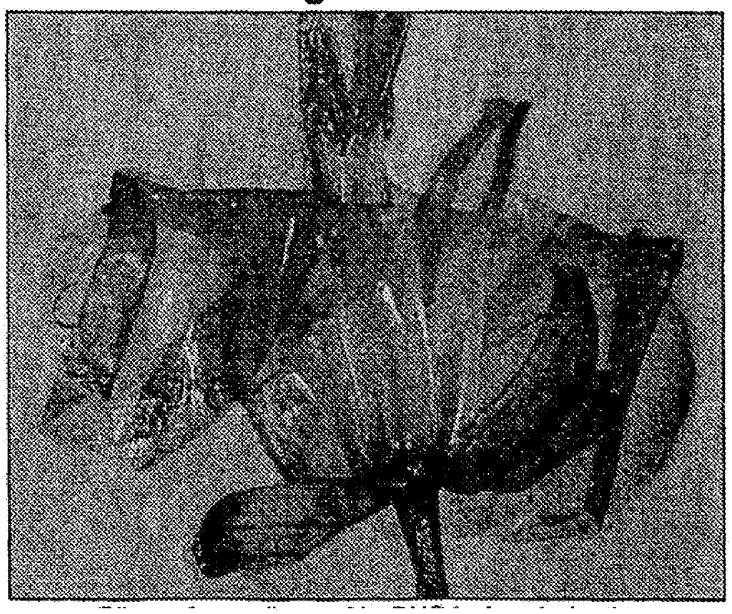
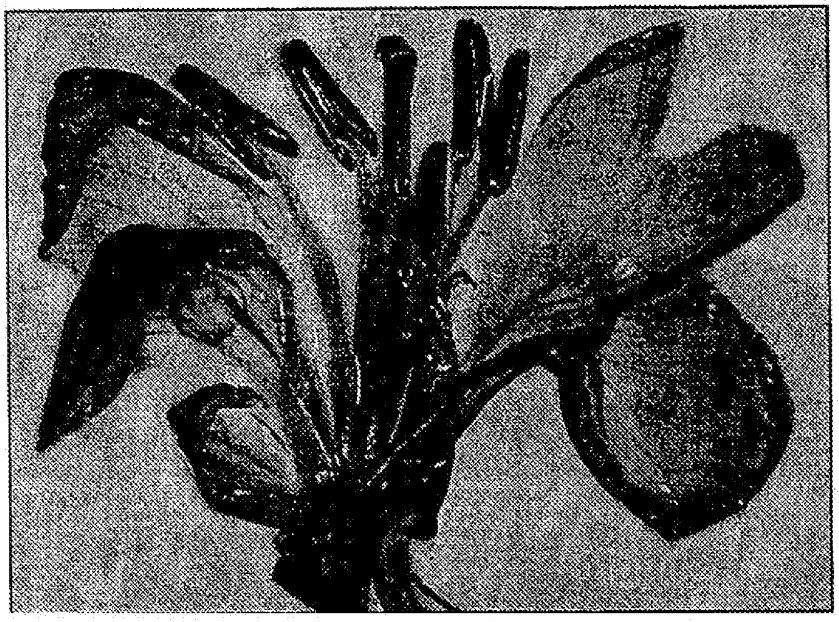


Fig.50.



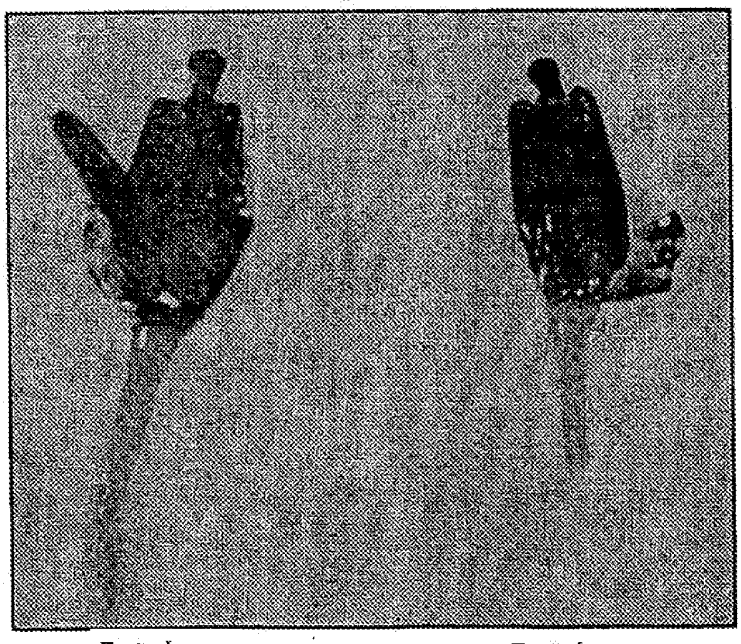
Flor de colza antes da indução Alc-GUS

Fig.51.



Flor de colza Alc-GUS dois dias após imersão das raízes em Etanol a 5%

Fig.52.



Tratada com H2O

Tratada com Etanol 5%

Gomos imaturos de colza (pétalas removidas)

Fig.53.

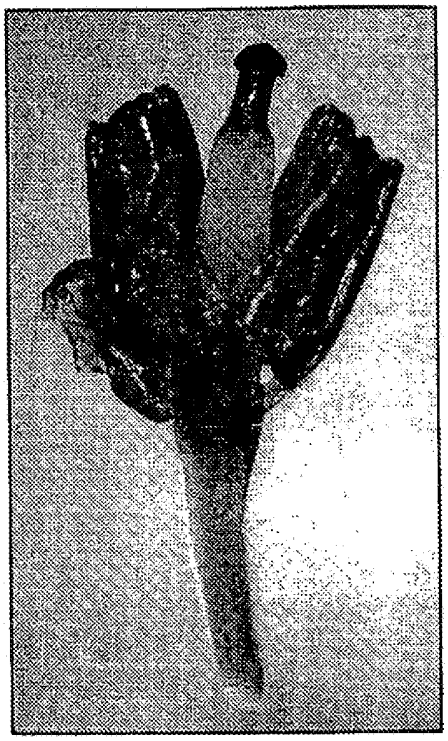


Imagem da flor de colza após emersão das raízes em etanol a 5%

Fig.54.

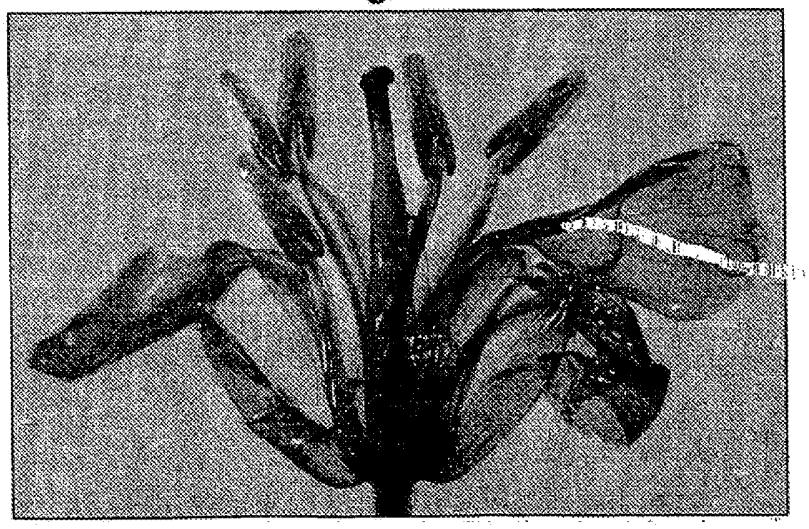


Imagem da flor de colza após emersão das raízes em etanol a 5%

Fig.55.

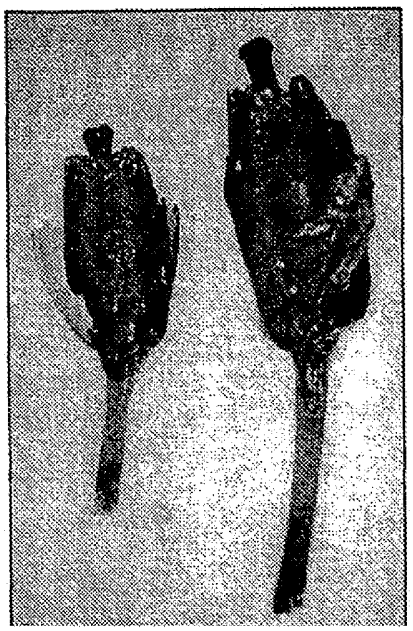
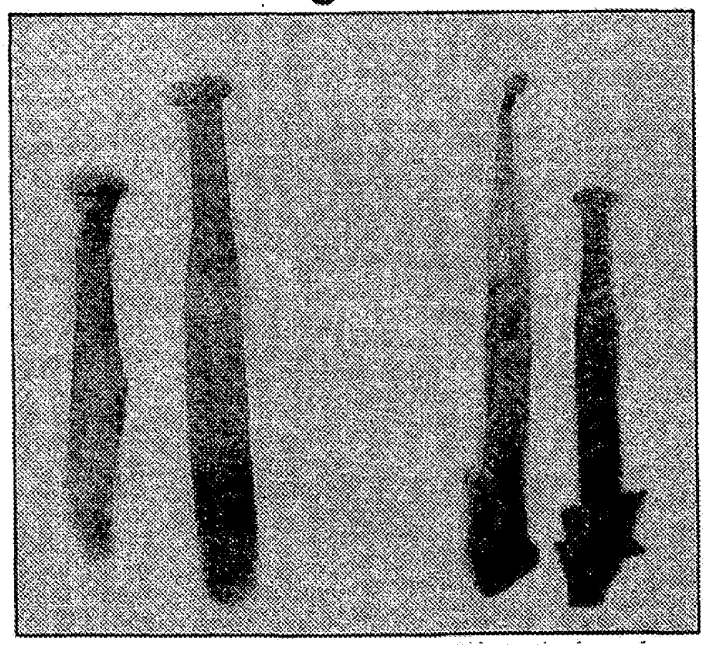


Imagem da flor de colza após emersão das raízes em etanol a 5%

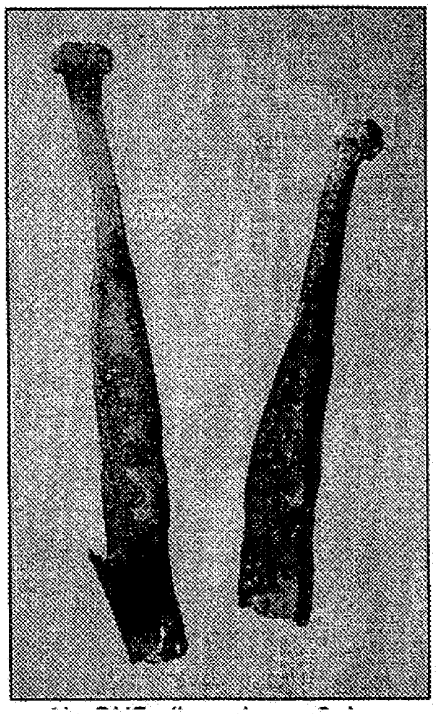
Fig.56.



Colza tipo selvagem

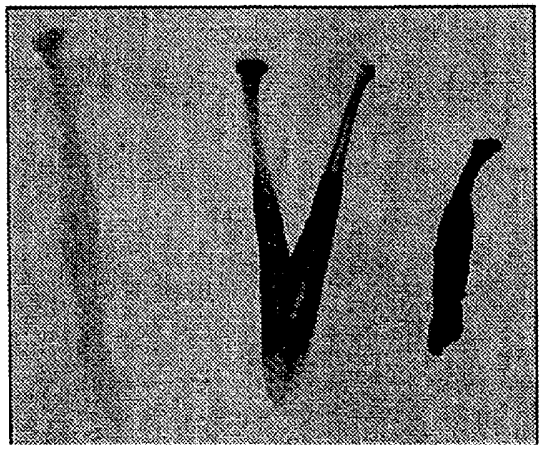
Colza Alc-GUS induzida em água

Fig.57.



Colza Alc-GUS 2 dias após imersão das sementes em etanol 2%

Fig.58.



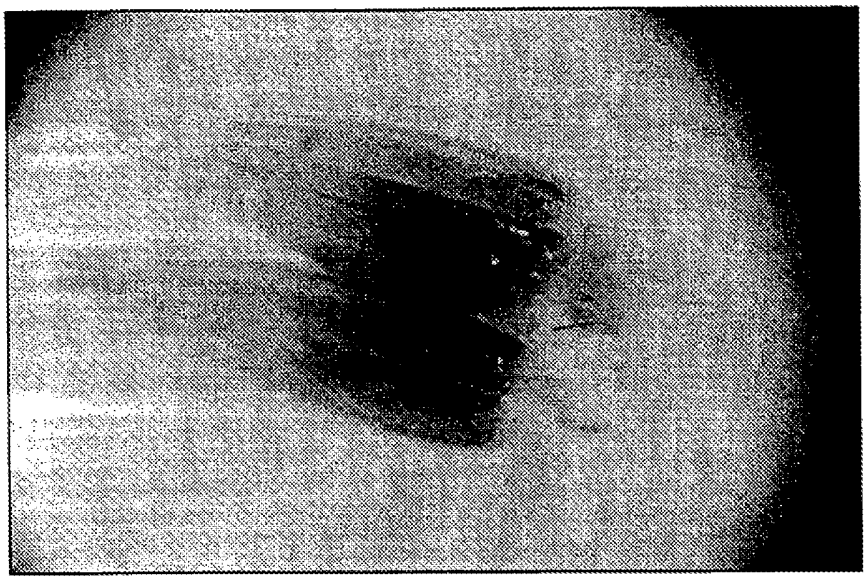
Plantas Alc-GUS tratadas Com H2O

Plantas Alc-GUS tratadas Etanol 5%

Fig.59.

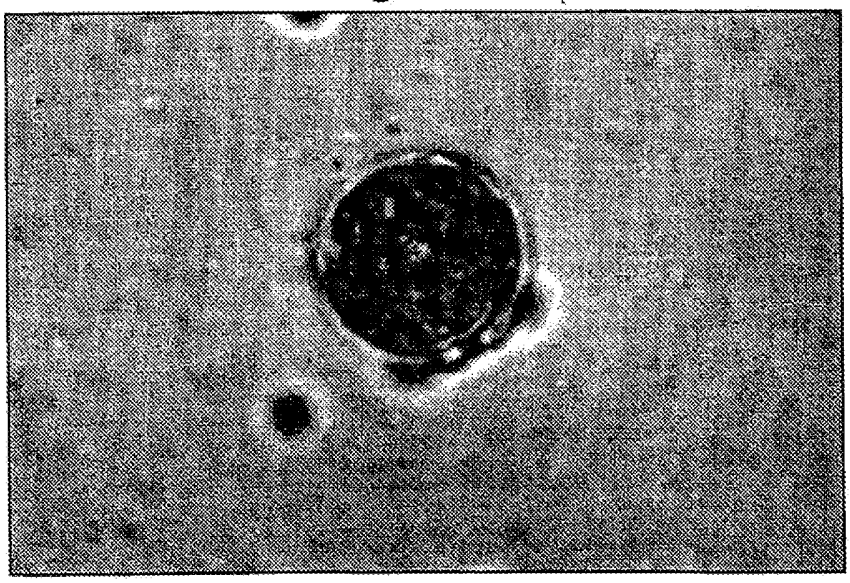
Flores de colza induzidas mantendo o caule da flor em 5% de Etanol, coradas após dois dias

Fig.60a.



Coloração GUS de expressão em anteras de tomate conduzida pelo promotor Alc A

Fig.60b.



Coloração GUS de expressão em pólen de tomate conduzida pelo promotor Alc A

Fig.61.

GGATCCTGAAACATATCAGTTGTGTTTGTTTTTGTAAAT
CTTTTATACTACTAGGGGAGAAAATTAGCTTAGTTCAA
TCGCATCTCATATGTCTAATTACCAGGGGAGAAAATTA
GCTTAGTTCATTTTGTTGCTGCCATATGGGTGAAAAAA
TAATGAGACATCTAAATCAGTAAATTGGAAATATAGC
ATCTTAAACCTGCAGGTAGTTTCTTAAACCTGATTCTA
GCTACAACTTAGTACAACTACTGGTAGTTTTTTAAACC
TGATTCTAGCTACATGTTTTATATTGTGGCACAAGAAC
TTTTAAGAACATATGCTGATGCCCACTGTATTTAGTTA
CTACTTCAAGACCAACTGTATTTTAGTTACAAATGTGT
TTTCAAGATTGTAGAAATTTGTAGCTGAAATTATCCAC
ACCATATTTGTGAACTGACATCATTTCTAAGAATATTA
CTGATTAGAATCTTTCACTTTTATAATGCTTTGCAGGAG
TGGCCCCTCTGGAGTTGAATATGCAGTTATAACCAAAT
TTTACCCCTTTTATCCTAGAAGAGTTGCCAAGACACGG
TATAAGACCATGATAATAGACTAAGAGAGGATTTGGC
TCTAATTACTATATGTTTTATTTATGCAGTCCCATGAGA
ACTTTGAGTATTTGCAGATTGCTTTATTAATTTATTAAA
GTTAAAGATTGTATGTGTTGAGTATGTATCCACTCTTGT
TGGAAGTGTCTTGCAATTCCAATCCAAGGATGTATAAA
ATACTGCATGGGCTAAGTATGTGTTTTTTCATGTATTTG
GAGTATATATACTTTTTGTTGCTTGAGAACATGTATGT
ACACTAGAAGCTTGTCAATTGTGTGAACTTGAGTTGAT
CCCTGTCTAACCTGAGTATATATATATATATATTTTGTT
GCTTGAGAACAAGTATGTACAATAGAGGCTTGACAAT
TGTGTGAACTTGAGTTGAACATGAATTTTGATAATCAC
AACTCACCATCCCTTTCAATATGCTTAGAATATAGCTT
TTTATAATTTTTCACCCTACAATACAAAATTGTTCTATG
AAGGCCATGGTACATCATCATATCCTGTATTATCAACC
TAGGATTTGTCTATTTCGATTAATAATGGCATTGAGTC
AAATTTTGGTTGTTTCAAATGATAGACTTCGATATTTGT
TATGATTTATGAGTTGATTCTTGATAGCATTACTAAAA
AATGACCTATGTATATACAAGTGTCTTCCGTTGCAACG
CACGGGCATATACCTAGTCAATCACTAAGACCCTAATT
TTGAAGTTGGGACTTAGACGTGTTCCACGTTTGTAAAG
GCGAGTATATAGGTGTATGTATATAAGAGCCGGTGTAT

Fig.61 (Cont).

ACAACAATTTTTTATAAGAAAACTTGAACAAGTAGCCA
GGTGTTGAAATCTTCATATATGTGCCGACGCCATTCAA
CATCATATTTGGCTTCTGGCGAGGATCGTAGTATCAAG
CAACATAAAAGCAATGACAAACAGCGAAGCACAAAG
ATCTCCCAGGCTCGTCATAAACTAATCACAATGTTGTT
TGTCCTCCACAATTAGCACAACCCATTTTAGAAAAAGA
TGCCACGATCGATCGAGACGTTGGCCAGCTATCAAAC
AGATAAGAACTACCCAAATATTTCCTAAATCCAGAAC
GGAAGACCCATTGACTAGGTCCTTACCTCTCAAATAGA
CAGACTATTCTTCTCCACATCAAAATATAGGGACTCCC
GATGCAACAAACACGGGCCACCACACAACAATGGTGA
AATGACCATGCATGCATCCACGTCCGTACGCAGCCATT
TCGTCTATAAATTTGCTTCCCATCCGATTCAACTACA<u>A</u>
GCTTGCGGGCAAAA<u>**ATG**</u>GCAAAGGCTC

O A sublinhado é o putativo ponto de partida transcricional,o ATG bold e sublinhado é o ponto de partida translacional