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

(21) PI 0808896-9 A2

* B R P I 0 8 0 8 8 9 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 14/03/2008
(43) Data da Publicação: 02/09/2014
(RPI 2278)

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

(54) Título: MÉTODO PARA CONTROLAR A EXPRESSÃO DE UM VARIANTE ALÉLICO DE UM GENE DE INTERESSE EM UMA PLANTA OU CÉLULA DE PLANTA, MÉTODO PARA CONTROLAR A EXPRESSÃO DE UMA MUTAÇÃO EM UMA PRIMEIRA PLANTA, PARES DE PLANTAS, PAR DE PLANTAS PARENTAIS, MÉTODO PARA GERAR PLANTAS DESPROVIDAS DE UM FENÓTIPO, CÉLULA, SEMENTE OU PROGENIE, MÉTODO PARA EXPRESSAR SELETIVAMENTE UM PRIMEIRO POLNUCLEOTÍDEO DE INTERESSE NA PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PLANTA MASCULINA ESTÉRIL.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2007 US 11/685,956

(73) Titular(es): Pioneer Hi-Bred International, INC.

(72) Inventor(es): Andrew M. Cigan, Erica Unger, Howard P. Hershey, Tim W. Fox, Yongzhong Wu

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2008056989 de 14/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/112970de 18/09/2008

MÉTODO PARA CONTROLAR A EXPRESSÃO DE UM VARIANTE ALÉLICO DE UM GENE DE INTERESSE EM UMA PLANTA OU CÉLULA DE PLANTA, MÉTODO PARA CONTROLAR A EXPRESSÃO DE UMA MUTAÇÃO EM UMA PRIMEIRA PLANTA, PARES DE PLANTAS, PAR DE PLANTAS PARENTAIS, MÉTODO PARA GERAR PLANTAS DESPROVIDAS DE UM FENÓTIPO PARTICULAR A PARTIR DE PLANTAS PARENTAIS QUE EXIBEM ESTE FENÓTIPO, CÉLULA, SEMENTE OU PROGENIE, MÉTODO PARA EXPRESSAR SELETIVAMENTE UM PRIMEIRO POLINUCLEOTÍDEO DE INTERESSE NA PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PLANTA MASCULINA ESTÉRIL

Campo da Invenção

A invenção se refere, em geral, a composições e métodos para a supressão de gene dominante. Certas concretizações fornecem métodos para prevenir a transmissão de transgenes em gametas. Certas concretizações compreendem pares de plantas nas quais o fenótipo dos parentais é reprimido na progênie. Certas concretizações fornecem constructos e métodos utilizáveis na geração de plantas parentais férteis que, quando cruzadas, geram plantas de progênie estéril, e métodos para produzir, manter e usar tais transgenes e plantas, bem como produtos de tais plantas. Certas concretizações fornecem um sistema para avaliação da expressão de variantes alélicos de um gene. Certas concretizações fornecem um sistema para simultaneamente romper a expressão de um gene endógeno e complementar sua expressão. Certas concretizações empregam promotores ortólogos e construtos compreendendo repetições invertidas destes.

Fundamentos da Invenção

O melhoramento de plantas provê um meio para combinar traços desejáveis em uma única variedade de planta ou híbrido, incluindo, por exemplo, resistência a doença, resistência a inseto, tolerância a seca, produtividade melhorada e melhor qualidade agronômica. As culturas em campo geralmente são melhoradas por polinização, incluindo a auto-polinização (*selfing*; *selfed*), na qual o pólen de uma flor é transferido para a mesma flor ou para uma outra flor da mesma planta, ou para uma planta geneticamente idêntica, e polinização cruzada (*crossing*; *crossed*), na qual o pólen de uma planta é transferido para uma flor de uma planta geneticamente diferente.

As plantas que são auto-polinizadas e selecionadas por tipo ao longo de muitas gerações tornam-se homozigotas e quase todos os lócus de gene produzem uma população uniforme de verdadeira progênie melhorada. Um cruzamento entre duas linhagens homozigotas diferentes produz uma população uniforme de plantas híbridas que podem ser heterozigotas em muitos lócus de gene. Um cruzamento de duas plantas, cada uma das quais é heterozigota em inúmeros lócus de gene, gera plantas híbridas que diferem geneticamente e não são uniformes.

Muitas plantas de cultivo, incluindo, por exemplo, milho (*corn*), podem ser melhoradas usando técnicas de auto-polinização ou polinização cruzada. O milho possui flores

masculinas e femininas separadas na mesma planta, localizadas no pendão e na espiga, respectivamente. A polinização natural ocorre no milho quando o vento sopra o pólen dos pendões para os estilo-estigmas que se projetam dos topos das espigas. Muitas plantas de cultivo, incluindo o milho, são crescidas como híbridas que, geralmente, apresentam maior vigor do que as plantas parentais das quais elas são derivadas. Dessa forma, é desejável evitar a polinização aleatória quando da geração de plantas híbridas.

As plantas híbridas (F1) são geradas pelo cruzamento de duas diferentes plantas parentais endogâmicas masculina (P1) e feminina (P2). As plantas híbridas são valiosas porque elas podem apresentar melhorada produtividade e vigor em comparação com as plantas parentais das quais as híbridas são derivadas. Adicionalmente, as plantas híbridas (F1), em geral, possuem mais propriedades desejáveis do que as plantas da progênie (F2) derivadas das plantas híbridas. Como tal, as plantas híbridas são comercialmente importantes e incluem muitas culturas agrícolas, incluindo, por exemplo, trigo, milho, arroz, tomate e melão. A hibridização de milho tem recebido particular atenção desde os anos 1930. A produção de milho híbrido envolve o desenvolvimento de linhagens masculina e feminina homozigotas endogâmicas, o cruzamento dessas linhagens e a avaliação dos produtos de cruzamento com relação ao desempenho agronômico melhorado. O melhoramento do pedigree e a seleção recorrente são dois dos métodos de melhoramento

usados para desenvolver linhagens endogâmicas a partir de populações. Os programas de melhoramento combinam caracteres desejáveis a partir de duas ou mais linhagens endogâmicas ou várias fontes amplamente baseadas em conjuntos de melhoramento a partir dos quais as novas linhagens endogâmicas são desenvolvidas por auto-polinização e seleção com relação a fenótipos desejados. Essas novas endogâmicas são cruzadas com outras linhagens endogâmicas e os novos híbridos resultantes são avaliados para determinar quais possuem desempenho melhorado ou outros caracteres desejáveis, aumentando, portanto, o valor comercial. A progênie híbrida de primeira geração, designada F_1, é mais vigorosa do que seus parentais endogâmicos. Este vigor híbrido, ou heterose, pode estar manifestado de várias maneiras, incluindo crescimento vegetativo aumentado e produtividade aumentada de semente.

A produção de semente híbrida requer a manutenção dos estoques de semente parental porque o auto-cruzamento de plantas híbridas produz progênie (F2) que, como P1 e P2, geralmente apresenta características menos desejáveis do que a planta híbrida F1. Em razão de as plantas parentais geralmente possuírem menor valor comercial do que os híbridos, esforços têm sido feitos para evitar o auto-cruzamento ("*selfing*") de plantas parentais presentes em um campo, na medida em que tais produtos de cruzamento reduzem a produtividade da semente híbrida. Conseqüentemente, métodos têm sido desenvolvidos para o auto-cruzamento de uma planta parental.

Um método para controlar a polinização é usar uma população parental de plantas que são estéreis masculinas, fornecendo, assim, a parental feminina. Diversos métodos têm sido usados para controlar a fertilidade masculina, incluindo, por exemplo, a emasculação manual ou mecânica (*detasseling*), a esterilidade masculina citoplasmática, a esterilidade masculina genética e o uso de gametocidas. Por exemplo, a auto-fecundação parental em um campo pode ser evitada pela remoção das anteras ou emasculação de plantas da população parental feminina (P2), removendo, assim, a fonte de pólen P2 do campo. As plantas femininas P2, depois, podem ser polinizadas com pólen P1 manualmente ou usando meios mecânicos. A semente híbrida de milho geralmente é produzida por um sistema de esterilidade masculina incorporando a emasculação manual ou mecânica. Fileiras alternadas de duas endogâmicas de milho são plantadas em um campo e os pendões portadores de pólen são removidos de uma das endogâmicas (feminina P2). Contanto que o campo seja suficientemente isolado de fontes de pólen de milho estrangeiro, as espigas endogâmicas emasculadas são fertilizadas somente pelo pólen da outra endogâmica (masculina P1); a semente resultante é híbrida e forma plantas híbridas. Infelizmente, este método é demorado e trabalhoso. Adicionalmente, a variação ambiental no desenvolvimento da planta pode resultar em plantas produtoras de pendões depois que a emasculação manual da parental feminina seja completada. Portanto, a emasculação pode não assegurar a completa esterilidade masculina de uma

planta endogâmica feminina. Neste caso, as plantas femininas férteis resultantes espalharão pólen com sucesso e algumas plantas femininas serão auto-polinizadas. Isto resultará na colheita de semente da endogâmica feminina juntamente com a semente híbrida desejada. A semente endogâmica feminina não é tão produtiva quanto a semente F1. Adicionalmente, a presença de semente endogâmica feminina pode representar um risco à segurança do germoplasma para a companhia produtora do híbrido. A semente endogâmica feminina pode também ser emasculada mecanicamente. A emasculação mecânica é aproximadamente tão confiável quanto a emasculação manual, mas é mais rápida e menos onerosa. Entretanto, a maioria das máquinas de emasculação produz mais danos às plantas do que a emasculação manual, o que reduz a produtividade da semente F1. Portanto, nenhuma forma de emasculação é, no presente, inteiramente satisfatória e, assim, continua a demanda pela existência de métodos alternativos de produção de híbrido que reduzam os custos de produção, aumentem a segurança de produção e eliminem a auto-polinização da parental feminina durante a produção da semente híbrida.

Um outro método de evitar a auto-fecundação da planta parental é utilizar plantas parentais que são estéreis masculinas ou estéreis femininas. Os genes de fertilidade masculina foram identificados em inúmeras plantas e incluem genes de fertilidade masculina dominante e recessiva. As plantas que são homozigotas em relação a um gene de fertilidade masculina recessiva não produzem pólen viável e

são utilizáveis como plantas parentais femininas. No entanto, um resultado das plantas femininas que sejam recessivas homozigotas com relação a um gene de fertilidade masculina é o de que elas não são capazes de auto-fecundação e, portanto, precisa ser provido um meio para obter pólen de forma a manter a linhagem de planta parental P2. Geralmente, uma mantenedora de linhagem de células, que seja heterozigota em relação ao gene de fertilidade masculina, e seja gerada pelo cruzamento de uma planta fértil masculina homozigota dominante com uma planta estéril feminina homozigota recessiva. As plantas mantenedoras heterozigotas são depois cruzadas com as plantas estéreis masculinas homozigotas recessivas para produzir uma população na qual 50% da progênie é estéril masculina. As plantas estéreis masculinas são depois selecionadas para uso na geração de híbridos. Como tal, o método requer etapas adicionais de melhoramento e seleção para se obter as plantas estéreis masculinas, adicionando, assim, tempo e dispêndio requerido para produzir as plantas híbridas.

Para suplantar a necessidade de ter que selecionar plantas estéreis masculinas a partir de plantas férteis masculinas geradas pelo cruzamento de uma linhagem de planta mantenedora com uma linhagem de planta feminina (estéril masculina), têm sido desenvolvidos métodos para se obter plantas estéreis masculinas pela expressão de uma molécula citotóxica em células dos órgãos reprodutores masculinos de uma planta. Por exemplo, um ácido nucléico

que codifica a molécula citotóxica pode estar ligado a um promotor *tapetum*-específico e introduzido nas células de planta, de modo que, sob expressão, a molécula tóxica mata as células de antera, conferindo à planta esterilidade masculina. Como acima mencionado, no entanto, tais plantas parentais femininas não podem ser auto-fecundadas e, portanto, requerem a preparação e uso de uma linhagem de planta mantenedora, a qual, quando cruzada com a parental feminina com esterilidade masculina restabelece a fertilidade, por exemplo, pelo provimento de um gene dominante de fertilidade masculina, ou pelo provimento de um meio para desativar ou de outra forma inibir a atividade do produto de gene citotóxico (ver patente número US 5,977,433).

Métodos adicionais para conferir esterilidade genética masculina têm sido descritos, incluindo, por exemplo, a geração de plantas com múltiplos genes mutantes em localizações separadas dentro do genoma que conferem esterilidade masculina (ver patentes números US 4,654,465 e US 4,727,219) ou com translocações cromossômicas (ver patentes números US 3,861,709 e US 3,710,511). Um outro método de conferir esterilidade genética masculina inclui identificar um gene que é requerido para a fertilidade masculina, silenciar o gene endógeno, gerar um transgene compreendendo um promotor induzível operacionalmente ligado a uma seqüência codificante do gene de fertilidade masculina, e inserir o transgene de volta à planta, gerando, assim, uma planta que é estéril masculina na

ausência do agente de indução, e pode ser restaurada para se tornar fértil masculina pela exposição da planta ao agente de indução (ver patente número US 5,432,068).

Apesar de os métodos previamente descritos para se obter e manter linhagens de planta híbrida terem sido utilizáveis no melhoramento de planta e para propósitos agrícolas, tais métodos requerem numerosas etapas e/ou linhagens adicionais para manter as populações de plantas estéreis masculinas ou estéreis femininas com a finalidade de se obter as plantas híbridas. Tais requisitos contribuem para aumentar os custos de crescimento das plantas híbridas e, conseqüentemente, resultar em custos aumentados para os consumidores. Portanto, existe a necessidade de métodos convenientes e eficazes para produzir plantas híbridas, e particularmente para gerar linhagens parentais que podem ser cruzadas para se obter plantas híbridas.

Um sistema confiável de esterilidade genética masculina forneceria inúmeras vantagens em relação aos outros sistemas. O trabalhoso processo de emasculação pode ser evitado em alguns genótipos pelo uso de endogâmicas masculino-estéreis citoplasmáticas (CMS). Na ausência de um gene restaurador da fertilidade, as plantas de uma endogâmica CMS são estéreis masculinas como resultado de fatores do genoma citoplasmático (não-nuclear). Portanto, esta característica CMS é herdada exclusivamente através da parental feminina em plantas de milho, na medida que somente a feminina provê o citoplasma para a semente

fertilizada. As plantas CMS são fertilizadas com o pólen de uma outra endogâmica que não é estéril-masculina. O pólen da segunda endogâmica pode ou não contribuir com genes que tornam as plantas híbridas férteis-masculinas. Usualmente, a semente de milho normal emasculado e semente CMS-produzida do mesmo híbrido precisam ser misturadas para assegurar que cargas adequadas de pólen estejam disponíveis para fertilização quando as plantas híbridas estiverem crescendo e para assegurar a diversidade citoplasmática.

Um outro tipo de esterilidade genética é revelado nas patentes números US 4,654,465 e US 4,727,219 de Brar *et al* Entretanto, esta forma de esterilidade genética masculina requer a manutenção de múltiplos genes mutantes em localizações separadas dentro do genoma e requer um sistema complexo de marcador para rastrear os genes, fazendo com que este sistema seja inconveniente. Patterson descreveu um sistema genético de translocações cromossômicas, o qual pode ser eficaz, mas é também muito complexo (ver, patentes números US 3,861,709 e US 3,710,511).

Muitas outras tentativas têm sido feitas para tratar dos problemas dos sistemas de esterilidade existentes. Por exemplo, Fabijanski et al, desenvolveu diversos métodos para causar esterilidade masculina em plantas (ver pedido EP 89/3010153.8, publicado como EP 329308 e pedido PCT/CA90/00037, publicado como WO 90/08828). Um dos métodos inclui a provisão na planta de um gene codificante de uma substância citotóxica que é expressado usando um promotor

tecido-específico masculino. Um outro envolve um sistema antisense no qual um gene crítico para fertilidade é identificado e um constructo antisense para o gene é inserido na planta. Mariani et al também mostraram diversos sistemas antisense citotóxicos (ver EP 89/401.194). Ainda outros sistemas usam genes "repressores" que inibem a expressão de outros genes críticos para a fertilidade masculina (ver WO 90/08829).

Ainda um aperfeiçoamento adicional deste sistema é aquele descrito na patente número US 5,478,369, no qual um método de conferir esterilidade masculina controlável é alcançado pelo silenciamento de um gene nativo para a planta que é crítico para a fertilidade masculina e depois introduzir uma cópia funcional do gene de fertilidade masculina sob o controle de um promotor induzível que controla a expressão do gene. A planta é, portanto, constitutivamente estéril, tornando-se estéril somente quando o promotor é induzido, permitindo a expressão do gene de fertilidade masculina.

Em inúmeras circunstâncias, um caractere particular de planta é expressado pela manutenção de uma condição recessiva homozigota. As dificuldades surgem em manter a condição homozigota quando o gene transgênico de restauração precisa ser usado para a manutenção. Por exemplo, o gene MS45 em milho (US 5.478.369) tem se mostrado crítico para a fertilidade masculina. Plantas heterozigotas ou homozigotas com relação a um alelo

dominante do MS45 são completamente férteis devido à natureza esporofítica do caractere de fertilidade do MS45. Uma mutação natural no gene MS45, designada ms45, confere um fenótipo de esterilidade masculina a plantas quando este alelo mutante está no estado homozigoto. Esta esterilidade pode ser revertida (ou seja, a fertilidade restaurada) quando a forma não-mutante do gene é introduzida na planta, através de métodos de complementação tanto de cruzamento normal como transgênico. Entretanto, a restauração da fertilidade por cruzamento remove a condição desejada de homozigoto recessiva, e ambos os métodos restauram a fertilidade completa masculina e evitam a manutenção de linhagens maternais masculinas estéreis. Os mesmos interesses surgem quando se controla a fertilidade feminina da planta, onde uma feminina recessiva homozigota precisa ser mantida pelo cruzamento com uma planta contendo um gene de restauração. Portanto há considerável valor não somente em controlar a expressão de genes de restauração em uma linhagem genética recessiva, mas também em controlar a transmissão dos genes restauradores para a progênie durante o processo de produção do híbrido.

Breve descrição das figuras

A Figura 1 fornece informação de identificação dos genes MS45, MS26, 5126, e BS7 e/ou promotores de *Zea mays*, *Oryza sativa*, e *Arabidopsis thaliana*.

A Figura 2 representa manutenção das mutações do homozigoto recessivo em plantas machos estéreis para produção de híbridos.

A Figura 3 mostra que o MS45 pIR de arroz é efetivo em suprimir o promotor correspondente de arroz mas não de milho.

A Figura 4 é um esquema de um vetor de complementação/supressão genérico.

A Figura 5 é um esquema de um vetor de complementação/supressão de MS45.

A Figura 6 é um esquema que mostra um desenho de vetor para manutenção de genes letais recessivos.

Sumário Da Invenção

A presente invenção é baseada na verificação de que o genótipo de um organismo (por exemplo, uma planta ou mamífero) pode ser modificado para conter alelos dominantes repressores ou constructos de transgene que reduzem, mas não retiram, a atividade de um gene, sendo que o fenótipo do organismo não é substancialmente afetado. Por exemplo, plantas que contêm alelos dominantes repressores e/ou constructos de transgene que reprimem a atividade de um gene de fertilidade masculina da planta, sem tornar a

planta estéril masculina, ou podem conter alelos dominantes repressores e/ou constructos de transgene que reprimem a atividade de um gene requerida para a viabilidade, sem matar a planta. Adicionalmente, os pares de tais plantas tendo genótipos selecionados compreendendo os alelos dominantes repressores ou constructos de transgene podem ser cruzados para produzir progênie que apresenta a mudança fenotípica (por exemplo, esterilidade masculina). A progênie de plantas compreendendo genes de fertilidade masculina reprimidos, por exemplo, pode ser utilizável como fêmea na produção de planta híbrida.

Conseqüentemente, em uma concretização, a presente invenção se refere a um par de plantas parentais, em que as plantas compreendendo o par parentais são férteis (por exemplo, fértil masculina e fértil feminina), e em que a progênie estéril (por exemplo, progênie estéril masculina) é produzida pelo cruzamento do par de plantas parentais. Um par de plantas parentais da invenção pode incluir, por exemplo, uma primeira planta tendo um primeiro gene endógeno de fertilidade inativado, sendo que a primeira planta é fértil; e uma segunda planta tendo um segundo gene endógeno de fertilidade inativado, sendo que a segunda planta é fértil. Um tal par de plantas parentais é ainda caracterizado pelo fato de que, se o primeiro gene endógeno de fertilidade é um gene de fertilidade masculina, então o segundo gene endógeno de fertilidade também é um gene de fertilidade masculina, e, semelhantemente, se o primeiro gene endógeno de fertilidade for um gene de fertilidade

feminina, então o segundo gene endógeno de fertilidade é também um gene de fertilidade feminina.

Em um par de plantas parentais da invenção, o primeiro gene endógeno de fertilidade e o segundo gene endógeno de fertilidade podem codificar produtos de gene que estão presentes em uma única rota envolvida com a verificação da fertilidade de uma planta, ou o primeiro gene endógeno de fertilidade e o segundo gene endógeno de fertilidade podem codificar produtos de gene que estão em rotas separadas, mas convergentes. Em ambos os casos, a presença de um único gene inativado de fertilidade em uma planta não afeta substancialmente a fertilidade da planta, ou de plantas derivadas da mesma, exceto quando uma primeira e segunda planta, como aqui definida, são cruzadas, a inativação de ambos, um primeiro e um segundo gene de fertilidade, nas plantas da progênie resulta na esterilidade das plantas da progênie (ou seja, esterilidade masculina ou esterilidade feminina).

O gene inativado de fertilidade pode ser inativado devido a, por exemplo, uma mutação (por exemplo, deleção, substituição ou inserção de um ou mais nucleotídeos na seqüência codificante ou não-codificante que reduz ou inibe a expressão do gene de fertilidade), incluindo, por exemplo, *knock out* do gene (por exemplo, por meio de um evento de recombinação homóloga), preferencialmente em ambos os alelos do gene de fertilidade. O gene inativado de

fertilidade também pode ser inativado devido, por exemplo, à expressão de um produto de gene tal como um produto de transgene (por exemplo, um RNA ou um polipeptídeo codificado) em células da planta nas quais o gene é normalmente expressado, ou em células do progenitor, em que o produto de gene reduz ou inibe a expressão do gene endógeno de fertilidade. Adicionalmente, em um par de plantas parentais da invenção, o primeiro gene endógeno de fertilidade e o segundo gene endógeno de fertilidade da segunda planta podem ser inativados na mesma rota ou em rotas diferentes. Por exemplo, o primeiro gene endógeno de fertilidade pode ser inativado devido a uma mutação, e o segundo gene endógeno de fertilidade pode ser inativado devido à expressão de um produto de transgene (por exemplo, um RNA *hairpin* compreendendo uma seqüência de nucleotídeos do promotor do segundo gene de fertilidade). A notação hpRNA como utilizada neste se refere a uma molécula de RNA promotora, e pode ser utilizada indiferentemente da notação "pIR" para promotor de repetição invertida.

Em várias concretizações, o par de plantas parentais pode incluir uma primeira planta, na qual o primeiro gene endógeno de fertilidade é inativado por uma mutação, e uma segunda planta tendo um segundo gene endógeno de fertilidade inativado por um modo diferente de uma mutação; ou pode incluir uma primeira planta na qual o primeiro gene endógeno de fertilidade é inativado por meio de uma mutação, e uma segunda planta na qual o segundo gene endógeno de fertilidade é inativado por uma mutação; ou

pode incluir uma primeira planta tendo um primeiro gene endógeno de fertilidade inativado de um modo diferente de mutação, e uma segunda planta na qual o segundo gene endógeno de fertilidade é inativado por um modo diferente de mutação. Em aspectos desta concretização, o primeiro ou segundo gene endógeno de fertilidade da primeira ou segunda planta é inativado por *knockout* do primeiro ou segundo gene de fertilidade, respectivamente; ou o primeiro ou segundo gene endógeno de fertilidade da primeira ou segunda planta é inativado por mutação do promotor do primeiro ou segundo gene de fertilidade, respectivamente. Em aspectos adicionais, os primeiro e segundo genes endógenos de fertilidade das primeira e segunda plantas são inativados por *knockout* dos primeiro e segundo genes de fertilidade, respectivamente; ou os primeiro e segundo genes endógenos de fertilidade das primeira e segunda plantas são inativados por mutação do promotor dos primeiro e segundo genes de fertilidade, respectivamente.

Em outras concretizações, em um par de plantas parentais da invenção, o primeiro gene endógeno de fertilidade é inativado devido à expressão, na primeira planta, de uma primeira molécula de ácido nucléico exógena compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de uma primeira molécula (RNA) de ácido ribonucléico *hairpin* (hp) (hpRNA), sendo que o primeiro hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos do primeiro promotor do gene endógeno de fertilidade, e em que, sob expressão, o primeiro hpRNA

reprime a expressão do primeiro gene endógeno de fertilidade; ou o segundo gene endógeno de fertilidade é inativado devido à expressão, na segunda planta, de uma segunda molécula de acido nucléico exógeno compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um segundo hpRNA compreendendo uma seqüência de nucleotídeos do segundo promotor de gene endógeno de fertilidade, e em que, sob expressão, o segundo hpRNA reprime a expressão do segundo gene endógeno de fertilidade; ou ambos, o primeiro gene endógeno de fertilidade e o segundo gene endógeno de fertilidade são inativados devido à expressão, na primeira planta e na segunda planta, de um primeiro hpRNA e um segundo hpRNA, respectivamente, tendo as características acima descritas. Em aspectos desta invenção, a primeira molécula de ácido nucléico exógeno, quando presente, está estavelmente integrada no genoma das células da primeira planta, ou a segunda molécula de ácido nucléico exógeno, quando presente, está estavelmente integrada no genoma das células da segunda planta; ou ambas, a primeira molécula de ácido nucléico exógeno, quando presente, e a segunda molécula de ácido nucléico exógeno, quando presente, estão estavelmente integradas no genoma das células da primeira planta e da segunda planta, respectivamente.

Quando um primeiro e/ou um segundo gene endógeno de fertilidade é inativado devido à expressão, em uma primeira e/ou uma segunda planta, respectivamente, de uma molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um promotor

operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um hpRNA, o promotor pode ser qualquer promotor que seja ativo em células de planta, por exemplo, um promotor constitutivamente ativo, (por exemplo, um promotor de ubiquitina), um promotor tecido específico, particularmente um promotor de tecido reprodutor (por exemplo, um promotor antera específico, tal como um promotor *tapetum* específico), um promotor induzível, ou um promotor desenvolvimento- ou estágio-específico. O gene de fertilidade que é inativado pode ser um gene de fertilidade masculina ou um gene de fertilidade feminina, desde que, se um gene de fertilidade masculina for inativado em uma primeira planta de um par de plantas parentais (ou seja, um primeiro gene endógeno de fertilidade masculina), a segunda planta do par de plantas parentais possui um gene de fertilidade masculina inativado que é diferente do primeiro gene endógeno de fertilidade masculina; e, reciprocamente, se um gene de fertilidade feminina estiver inativado em uma primeira planta de um par de plantas parentais (ou seja, um primeiro gene endógeno de fertilidade feminina), a segunda planta do par de plantas parentais possui um gene de fertilidade feminina inativado que é diferente do primeiro gene endógeno de fertilidade feminina. Adicionalmente, a inativação de um primeiro ou segundo gene endógeno de fertilidade, sozinho, não torna uma planta estéril, enquanto que um cruzamento de uma primeira planta tendo o primeiro gene de fertilidade inativado e uma segunda planta tendo o segundo gene de fertilidade inativado gera progênie que é estéril.

Em uma outra concretização, a presente invenção se refere a um par de plantas transgênicas de melhoramento, o qual inclui uma primeira planta transgênica fértil tendo integrada em seu genoma uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um primeiro hpRNA, sendo que o primeiro hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos oriunda de um primeiro promotor de gene de fertilidade endógeno, e em que, sob expressão, o primeiro hpRNA reprime a expressão do primeiro gene de fertilidade endógeno; e uma segunda planta transgênica fértil tendo integrada em seu genoma uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um segundo hpRNA, sendo que o segundo hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos a partir de um segundo promotor de gene de fertilidade endógeno, sendo que o segundo gene de fertilidade endógeno é diferente do primeiro gene de fertilidade endógeno, e em que, sob expressão, o segundo hpRNA reprime a expressão do segundo gene de fertilidade endógeno. Como aqui revelado, o primeiro gene endógeno é diferente do segundo gene endógeno e, adicionalmente, se em um par de plantas parentais o primeiro gene de fertilidade endógeno da primeira planta for um gene de fertilidade masculina, então o segundo gene de fertilidade endógeno da segunda planta do par de plantas parentais também é um gene de fertilidade masculina; enquanto que se o primeiro gene de fertilidade endógeno da

primeira planta for um gene de fertilidade feminina, então o segundo gene de fertilidade endógeno da segunda planta também é um gene de fertilidade feminina.

Em certas concretizações, em uma molécula de ácido nucléico exógeno contida em uma primeira ou segunda planta transgênica de um par de plantas parentais da invenção, a seqüência de nucleotídeos codificante do primeiro ou segundo hpRNA, respectivamente, é tal que ela inclui a seqüência do promotor do gene de fertilidade que é para ser inativado, particularmente uma repetição invertida da seqüência de promotor tal que, sob expressão, a auto-hibridização do RNA resulta na formação do hpRNA. Como tal, a seqüência de nucleotídeos, quando expressada em uma célula, forma uma molécula de RNA *hairpin* (ou seja, um hpRNA), o qual reprime (ou seja, reduz ou inibe) a expressão do gene de fertilidade endógeno a partir de seu promotor endógeno.

O promotor, que está operacionalmente ligado à seqüência de nucleotídeos codificante do hpRNA em uma molécula de ácido nucléico exógeno contida em uma primeira ou segunda planta transgênica de um par de plantas parentais, pode ser qualquer promotor que é ativo em células de planta, particularmente um promotor que é ativo (ou que pode ser ativado) em tecidos reprodutores de uma planta (por exemplo, estames ou ovários). Como tal, o promotor pode ser, por exemplo, um promotor

constitutivamente ativo, um promotor induzível, um promotor tecido-específico ou um promotor específico de estágio de desenvolvimento. Da mesma forma, a primeira molécula de ácido nucléico exógeno pode ser a mesma ou diferente do promotor da segunda molécula de ácido nucléico exógeno.

Em geral, um promotor é selecionado com base, por exemplo, no fato de se os genes de fertilidade endógenos a serem inibidos são genes de fertilidade masculina ou genes de fertilidade feminina. Portanto, quando os genes endógenos a serem inibidos são genes de fertilidade masculina (por exemplo, um gene BS7 e um gene SB200), o promotor pode ser um promotor estame-específico e/ou pólen-específico, tal como um promotor do gene MS45 (patente US 6.037.523), um promotor do gene 5126 (patente US 5.837.851), um promotor do gene BS7 (WO 02/063021), um promotor do gene SB200 (WO 02/26789), um promotor do gene TA29 (Nature 347:737 (1990)), um promotor do gene PG47 (patente US 5.412.085; patente US 5.545.546; Plant J 3(2):261-271 (1993)), um promotor do gene SGB6 (patente US 5.470.359) um promotor do gene G9 (patente US 5,837,850; patente US 5,589,610), ou semelhante, tal que o hpRNA é expressado em antera e/ou pólen ou em tecidos que dão origem a células de antera e/ou pólen, reduzindo ou inibindo, por esse meio, a expressão dos genes de fertilidade masculina endógenos (ou seja, inativando os genes de fertilidade masculina endógenos). Comparativamente, quando os genes endógenos a serem inibidos são genes de fertilidade masculina, o promotor

pode ser um promotor específico de ovário, por exemplo. Entretanto, como aqui revelado, pode ser usado qualquer promotor que dirija a expressão do hpRNA no tecido reprodutor de interesse, incluindo, por exemplo, um promotor constitutivamente ativo tal como um promotor de ubiquitina que, em geral, efetua a transcrição na maioria ou em todas as células de planta.

A presente invenção também provê células de uma primeira ou de uma segunda planta ou de ambas, uma primeira e uma segunda planta de um par de plantas parentais da invenção. Adicionalmente, são providas as sementes da primeira planta e/ou da segunda planta, como o são os cortes da primeira e segunda planta.

Adicionalmente, a presente invenção se refere a um organismo transgênico não-humano que é recessivo homozigoto com relação a um genótipo recessivo, em que o organismo transgênico contém uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno expressável compreendendo um primeiro promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo codificante de um gene restaurador (*restorer gene*), cuja expressão restaura o fenótipo que está de outra forma ausente devido a um genótipo recessivo homozigoto, e uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno codificante de um hpRNA. O organismo transgênico não-humano pode ser qualquer organismo não-humano que tenha um genoma diplóide (ou de

mais alto grau), incluindo, por exemplo, mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios, ou plantas.

Em uma concretização, a segunda molécula de ácido nucléico exógeno expressável de uma planta transgênica da invenção codifica um hpRNA específico para o primeiro promotor, o qual dirige a expressão do gene restaurador. Em um aspecto desta concretização, a segunda molécula de ácido nucléico exógeno expressável adicionalmente compreende um segundo promotor operacionalmente ligado à seqüência de nucleotídeos codificante do hpRNA. O segundo promotor, em geral, é diferente do primeiro promotor (da primeira molécula de ácido nucléico exógeno expressável) e pode ser, por exemplo, um promotor constitutivo, um promotor induzível, um promotor tecido-específico, ou um promotor estágio de desenvolvimento-específico, tal que o hpRNA pode ser expressado no organismo transgênico em um modo constitutivo, ou em um estágio de desenvolvimento particular. Em uma outra concretização, a segunda molécula de ácido nucléico exógeno expressável de uma planta transgênica da invenção codifica um hpRNA específico em relação a um promotor diferente do primeiro promotor que dirige a expressão do gene restaurador da primeira molécula de ácido nucléico exógeno expressável.

Um organismo transgênico não-humano da invenção é aqui exemplificado por uma planta transgênica que é recessiva homozigota com relação a um genótipo recessivo estéril (por

exemplo, a recessiva homozigota com relação ao gene ms45, o qual é um gene de fertilidade masculina), e que contém (a) um primeiro transgene expressável compreendendo um primeiro promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um gene restaurador, o qual, sob expressão, restaura a fertilidade para a planta transgênica (por exemplo, um transgene compreendendo uma seqüência codificante de MS45) e (b) um segundo transgene expressável codificante de um hpRNA, o qual, sob expressão, reprime a expressão por meio de um segundo promotor, o qual é diferente do primeiro promotor. Em uma concretização, o primeiro promotor é um promotor regulado constitutivamente ou pelo modo de desenvolvimento, sendo que o gene restaurador de fertilidade é expressado na planta transgênica, e a planta transgênica é fértil. Em uma outra concretização, o primeiro promotor é um promotor induzível, sendo que, sob contato da planta transgênica com um agente de indução apropriado, a expressão do gene restaurador de fertilidade é induzida, tornando fértil a planta transgênica.

Em uma outra concretização, a presente invenção também se refere a um par de organismos transgênicos não-humanos de melhoramento, incluindo um primeiro organismo transgênico e um segundo organismo transgênico, cada um dos quais é recessivo homozigoto para o mesmo genótipo recessivo. O par de plantas parentais é ainda caracterizado pelo fato de que o primeiro organismo transgênico contém uma molécula de ácido nucléico exógeno expressável

compreendendo um primeiro promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um gene restaurador, a expressão do qual restaura o fenótipo que de outra forma estaria ausente devido ao genótipo recessivo homozigoto, e uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno expressável que codifica um hpRNA específico para um segundo promotor, o qual é diferente do primeiro promotor. O segundo organismo transgênico contém uma terceira molécula de ácido nucléico exógeno expressável compreendendo o segundo promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um gene restaurador, a expressão do qual restaura o fenótipo que de outra forma estaria ausente devido ao genótipo recessivo homozigoto, e uma quarta molécula de ácido nucléico exógeno expressável que codifica um hpRNA específico para o primeiro promotor. O primeiro e o segundo organismos transgênicos não-humanos são ainda caracterizados pelo fato de que, quando melhorados um com o outro, é produzida uma progênie na qual o segundo hpRNA inibe a expressão do gene restaurador do primeiro transgene e o primeiro hpRNA inibe a expressão do gene restaurador do terceiro transgene, de modo que a progênie apresenta o fenótipo recessivo do genótipo recessivo homozigoto.

Um par de organismos transgênicos não-humanos de melhoramento da invenção é exemplificado por um par de plantas transgênicas de melhoramento, como a seguir descrito.

A primeira planta do par é uma planta transgênica fértil possuindo um genótipo estéril recessivo homozigoto, tendo integrado em seu genoma uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificante de um gene restaurador de fertilidade operacionalmente ligado a um primeiro promotor heterólogo, sendo que a expressão do gene restaurador restaura a fertilidade da primeira planta transgênica, e uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um primeiro hpRNA, em que o primeiro hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos de um segundo promotor, e em que, sob expressão, o primeiro hpRNA reprime a expressão a partir do segundo promotor, que é diferente do primeiro promotor.

A segunda planta transgênica do par possui o mesmo genótipo estéril recessivo homozigoto da primeira planta transgênica, e tem, integrada em seu genoma, uma terceira molécula de ácido nucléico exógeno que compreende uma seqüência de nucleotídeos codificante do gene restorer operacionalmente ligado ao segundo promotor, o qual é heterólogo em relação ao gene restaurador de fertilidade, sendo que a expressão do gene restaurador restaura a fertilidade da segunda planta transgênica; e uma quarta molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um segundo hpRNA, sendo que o segundo hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos do primeiro promotor heterólogo, e sendo que, sob expressão, o segundo hpRNA reprime a expressão da

primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo o primeiro promotor heterólogo.

Como aqui revelado, na progênie de um cruzamento da primeira e segunda plantas transgênicas, o segundo hpRNA reprime a expressão da primeira molécula de ácido nucléico exógeno, incluindo o gene restaurador de fertilidade contido nela, e o primeiro hpRNA reprime a expressão da terceira molécula de ácido nucléico exógeno, incluindo o gene restaurador de fertilidade contido nela. Como tal, a progênie é estéril, por exemplo, estéril feminina. Um par de plantas transgênicas de melhoramento da invenção pode ser recessivo homozigoto em relação a genes de fertilidade masculina (ou seja, estéril masculina, exceto sob expressão do gene restaurador de fertilidade), ou pode ser recessivo homozigoto em relação a genes de fertilidade feminina (ou seja, estéril feminina, exceto sob expressão do gene restaurador de fertilidade).

Em um aspecto, um par de plantas transgênicas de melhoramento da invenção inclui uma primeira planta transgênica, a qual é recessiva homozigota em relação ao ms45, sendo que a primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreende uma seqüência de nucleotídeos codificante do MS45 ligada a um promotor do gene 5126, e a segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreende um primeiro hpRNA compreendendo uma repetição invertida de um promotor do gene BS7. O dito par de plantas parentais ainda

inclui uma segunda planta transgênica, a qual é recessiva homozigota em relação ao ms45, sendo que a terceira molécula de ácido nucléico exógeno compreende uma seqüência de nucleotídeos codificante do MS45 operacionalmente ligada ao promotor do gene BS7, e a quarta molécula de ácido nucléico exógeno compreende um segundo hpRNA compreendendo uma repetição invertida do promotor do gene 5126. Cruzando-se tais primeira e segunda plantas trasngênicas, são obtidas plantas da progênie estéril masculina.

A presente invenção também se refere a métodos para produzir uma planta estéril. Um tal método pode ser realizado pelo cruzamento de um par de plantas parentais como aqui revelado. Em uma concretização, a primeira planta do par de plantas parentais contém uma mutação de desativação de um primeiro gene endógeno de uma rota envolvida na fertilidade masculina, e a segunda planta contém um segundo gene endógeno da mesma rota ou de uma rota diferente, mas convergente, também envolvida na esterilidade masculina, sendo que as plantas da progênie são mutantes dobrados e possuem um fenótipo estéril masculino. Em uma outra concretização, o método é realizado usando primeira e segunda plantas transgênicas, cada uma contendo um transgene codificante de hpRNA que inativa o respectivo gene de fertilidade endógeno na segunda e primeira plantas transgênicas, em que as plantas da progênie produzidas pelo cruzamento das plantas parentais apresentam o fenótipo estéril.

A presente invenção também se refere a um método para produzir um organismo transgênico não-humano que apresenta um fenótipo recessivo, pelo melhoramento de organismos transgênicos parentais que não apresentam o fenótipo recessivo. Por exemplo, a invenção provê métodos para produzir uma planta de progênie estéril pelo cruzamento de primeira e segunda plantas transgênicas, cada uma das quais é recessiva homozigota em relação ao mesmo gene de fertilidade, sendo que, na primeira planta transgênica, um gene restaurador de fertilidade é expressado a partir de um primeiro promotor e é expressado um hpRNA que reprime a expressão de um segundo promotor, e em uma segunda planta transgênica, o gene restaurador de fertilidade é expressado a partir de um segundo promotor, e é expressado um segundo hpRNA que reprime a expressão do primeiro promotor. As plantas da progênie estéril podem ser plantas estéreis femininas ou estéreis masculinas. Por exemplo, em um cruzamento de uma primeira planta transgênica contendo uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificante do MS45 operacionalmente ligada a um promotor do gene 5126, e uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um primeiro hpRNA incluindo uma seqüência de nucleotídeos de um promotor do gene BS7; e uma segunda planta transgênica contendo uma terceira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificante do MS45 operacionalmente ligada ao promotor do gene BS7, e uma quarta molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um segundo hpRNA incluindo uma seqüência de nucleotídeos do

promotor do gene 5126, é produzida a progênie estéril masculina. Conseqüentemente, a invenção provê uma planta produzida por um método como aqui revelada, por exemplo, uma planta estéril masculina.

A presente invenção ainda se refere a um método para produzir semente de planta híbrida. Um tal método pode ser realizado, por exemplo, por meio de polinização (por exemplo, naturalmente, mecanicamente, ou manualmente) de uma planta estéril masculina produzida como aqui revelada com pólen de uma planta fértil masculina que contém pelo menos um alelo dominante correspondente ao genótipo estéril recessivo homozigoto da planta estéril masculina, pelo que as plantas estéreis masculinas polinizadas produzem semente híbrida. Como tal, a invenção também provê semente híbrida produzida por um tal método. A presente invenção se refere a um método de obtenção de uma planta híbrida por meio do crescimento de uma tal semente híbrida e, adicionalmente, provê plantas híbridas produzidas pelo crescimento de tal semente híbrida.

A presente invenção ainda se refere a um método para identificar uma função de um gene expressado em uma célula. O gene expressado na célula pode ser qualquer gene contendo um promotor, incluindo um gene endógeno, o qual contém um promotor endógeno. Um método para identificar uma função de gene pode ser realizado, por exemplo, por meio da introdução, em uma célula na qual o gene é expressado, de

uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificante de um hpRNA operacionalmente ligada a um primeiro promotor heterólogo, sendo que o hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos de um promotor endógeno do gene cuja função está sendo examinada, e em que, sob expressão, o hpRNA reprime a expressão do gene; e detectar uma mudança em um fenótipo da célula sob expressão do hpRNA em comparação com um fenótipo do tipo selvagem na ausência de expressão do hpRNA, pelo que a mudança no fenótipo identifica a função do gene. Em um aspecto, o método ainda inclui a introdução, na célula, de uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificante de um polipeptídeo codificado pelo gene do segundo promotor heterólogo, sendo restaurado o fenótipo do tipo selvagem.

Um método da invenção pode ser praticado usando-se células simples contendo o gene de interesse, ou pode ser praticado usando um organismo contendo a célula. O organismo pode ser qualquer organismo de interesse no qual o gene de interesse é expressado. Em uma concretização, a célula é uma célula de planta, a qual pode ser uma célula de planta *in vitro* ou pode ser uma ou mais células de uma planta *in situ*. Em uma concretização, o organismo é uma planta transgênica, a qual contém a primeira molécula de ácido nucléico exógeno estavelmente integrada em seu genoma. Em um aspecto desta concretização, a planta transgênica ainda contém, integrada em seu genoma, uma

segunda molécula de ácido nucléico exógeno (compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificante de um polipeptídeo codificado pelo gene de interesse) operacionalmente ligado a um segundo promotor heterólogo, em que, sob expressão da segunda molécula de ácido nucléico exógeno do segundo promotor heterólogo, o fenótipo do tipo selvagem é restaurado.

Em algumas concretizações, a presente invenção se refere à dificuldade na propagação de uma planta tendo um caractere reprodutivo recessivo homozigoto sem perder a condição recessiva homozigota na progênie resultante. Isto pode ser realizado pela introdução, em uma planta, de pelo menos um cosntructo de transgene de restauração, operacionalmente ligado (1) a uma primeira seqüência de nucleotídeos compreendendo uma cópia funcional de um transgene que complementa o caractere fenotípico mutante produzido pela condição recessiva homozigota com (2) uma segunda seqüência funcional de nucleotídeos que interfere com a formação, função ou dispersão dos gametas masculinos da planta e está operacionalmente ligada a um promotor gameta-masculino-tecido-preferido. Este constructo é mantido no estado homozigoto e uma planta contendo um tal constructo é aqui referida como mantenedora. Quando for usada a planta mantenedora contendo um tal constructo ligado como uma doadora de pólen para fertilizar a planta recessiva homozigota, os únicos gametas masculinos viáveis providos para a planta recessiva homozigota são aqueles que contêm o alelo recessivo, e não contêm qualquer componente

do constructo do transgene. Nenhum dos grãos de pólen que contêm o constructo de transgene de restauração é viável devido à ação do segundo gene ligado que evita a formação de pólen viável. Portanto, a progênie resultante de um tal cruzamento sexual é não-transgênica com relação a este constructo de transgene.

Apesar de o pólen não viável produzido pela mantenedora conter o constructo de transgene de restauração, 50% dos óvulos (o gameta feminino) da mantenedora conterão o constructo de transgene de restauração. Portanto, a mantenedora pode ser propagada por auto-fertilização, com o constructo de transgene de restauração segregando de tal forma que ele estará contido em 50% das sementes da espiga de uma mantenedora auto fertilizada. Pela ligação do constructo de transgene de restauração com um marcador selecionável, os 50% de sementes contendo o transgene podem ser isolados para propagar a população mantenedora, a qual permanece homozigota em relação ao gene recessivo e hemizigota em relação ao constructo de transgene de restauração.

Em uma concretização adicional, se o gameta feminino for proibido de ser formado ou de ser funcional, será desejável ligar o gene capaz de complementar este fenótipo mutante com um promotor induzível para ajudar na manutenção da planta mantenedora. Uma tal planta, quando exposta à condição de indução, terá a fertilidade feminina

restaurada, e a planta pode, depois, ser auto fertilizada para produzir a progênie tendo ambos os caracteres mutantes recessivos desejados e o constructo de transgene de restauração.

Apesar de a invenção ser exemplificada em plantas, uma pessoa especialista na técnica pode reconhecer sua aplicabilidade em outros organismos não-humanos, incluindo mamíferos. Por exemplo, a invenção engloba um método de reprimir um fenótipo em progênie de um par parental de organismos não-humanos, sendo que (a) dito fenótipo é expressado em cada um de ditos parentais; (b) o genoma de cada parental é manipulado de modo a inativar um gene que afeta o fenótipo de interesse, e (c) o gene inativado no primeiro parental codifica um produto de gene diferente daquele gene inativado no segundo parental.

Descrição Detalhada da Invenção

As concretizações da invenção refletem a verificação de que o genótipo de um organismo pode ser modificado para conter alelos repressores dominantes ou constructos de transgene que reprimem (ou seja, reduzem, mas não removem por ablação) a atividade de um gene, sendo que o fenótipo do organismo não é substancialmente afetado.

Em algumas concretizações, a presente invenção é exemplificada com relação à fertilidade da planta, e mais

particularmente com relação à fertilidade masculina da planta. Por exemplo, as plantas podem ser geneticamente modificadas para conter um constructo de transgene codificante de moléculas de RNA hairpin (hpRNA) que reprime a expressão de um gene de fertilidade masculina endógeno sem tornar a planta estéril masculina.

Em um exemplo, o Gene A e o Gene B modulam etapas seqüenciais (mas não necessariamente consecutivas) em uma rota que leva a um produto. Em uma primeira planta, o Gene A é reprimido de modo a reduzir, mas não remover por ablação, a atividade do Gene A. A rota não é substancialmente inibida, e, portanto, o fenótipo de dita primeira planta não é afetado. Em uma segunda planta, o Gene B é reprimido de modo a reduzir, mas não remover por ablação, a atividade do Gene B. A rota não é substancialmente inibida, e, portanto, o fenótipo de dita segunda planta não é afetado. Na progênie de um cruzamento de ditas primeira e segunda plantas, a combinação de repressão do Gene A e Gene B leva à perda do produto da rota e a uma mudança em fenótipo. A repressão do Gene A e/ou Gene B pode ser realizada pelo uso de constructos hairpin (hpRNA) como aqui descrito ao longo do texto.

Em um outro exemplo, o Gene A e o Gene B modulam as etapas de rotas convergentes antes do ponto de convergência, e a rota convergida leva a um produto. Em uma primeira planta, o Gene A é reprimido de modo a reduzir, mas não remover por ablação, a atividade do Gene A, e o

fenótipo de dita primeira planta não é afetado. Em uma segunda planta, o Gene B é reprimido de modo a reduzir, mas não remover por ablação, a atividade do Gene B, e o fenótipo de dita segunda planta não é afetado. Na progênie de um cruzamento de ditas primeira e segunda plantas, a combinação de repressão do Gene A e Gene B leva à perda do produto das rotas convergentes. A repressão do Gene A e/ou Gene B pode ser realizada pelo uso de constructos hairpin (hpRNA) como aqui descrito ao longo do texto.

Em certas concretizações, o Gene A e o Gene B modulam as etapas das rotas envolvidas na fertilidade da planta. Dessa maneira, por exemplo, os cruzamentos de plantas fenotipicamente férteis que expressam moléculas hpRNA que são tornadas alvo podem gerar plantas estéreis masculinas. Por exemplo, as plantas parentais tendo um genótipo estéril masculino recessivo homozigoto podem ser transformadas de tal maneira que cada uma expresse um gene restaurador de fertilidade masculina a partir de diferentes promotores heterólogos e hpRNAs que reprimem a expressão do gene restaurador na outra planta parental. Tais plantas parentais, que são férteis, podem ser cruzadas uma com a outra para gerar plantas estéreis masculinas. Isto é exemplificado por um par de plantas férteis-masculinas, A e B. Cada uma possui um genótipo estéril masculino recessivo homozigoto, ms45ms45. Em constructos simples ou múltiplos, a planta A é transformada com um promotor 5126 operacionalmente ligado a um gene MS45 restorer, e um hpRNA específico para o promotor BS7. Em constructos simples ou

múltiplos, a planta B é transformada com um promotor BS7 operacionalmente ligado a um gene restaurador de MS45, e um hpRNA específico para o promotor 5126. A Planta A e a Planta B são, cada uma, fértil-masculina devido à presença do restaurador de MS45. Em um cruzamento da Planta A com a Planta B, a restauração da fertilidade é revertida devido à ação dos constructos hairpin complementares alvo em relação aos respectivos promotores que dirigem o gene restaurador, e a progênie de dito cruzamento é estéril-masculina. Tal progênie é utilizável como fêmeas em produção híbrida. O pólen do tipo-selvagem pode restaurar a fertilidade no híbrido devido à natureza recessiva do alelo ms45.

Certas concretizações da invenção compreendem um organismo transgênico não-humano tendo um genótipo recessivo homozigoto que resulta na ausência de um fenótipo de interesse particular, dito organismo ainda compreendendo (a) uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um gene restaurador para o fenótipo particular, operacionalmente ligado a um primeiro promotor; e (b) uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um segundo promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de uma primeira molécula de ácido ribonucléico hairpin (hpRNA), sendo que o primeiro hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos do primeiro promotor ou uma seqüência de nucleotídeos de um terceiro promotor, em que dito organismo transgênico não-humano apresenta o fenótipo de interesse.

A agroindústria produz culturas que são usadas para alimentar indivíduos humanos e animais, e que são ainda usados em outras indústrias para preparar produtos tão diversos quanto adesivos e explosivos. O milho (*corn*), por exemplo, é usado como alimento humano, ração animal (por exemplo, alimento de gado de corte, gado leiteiro, suínos, e aves), e como matéria prima na indústria. Os usos alimentícios do milho incluem o consumo de grãos de milho, bem como produtos de indústrias de moagem a seco e moagem a úmido (por exemplo, farelo grosso, farelo, farinha, amido de milho, xaropes de milho e dextrose). O óleo de milho é separado a partir do germe de milho, o qual é o subproduto das indústrias de moagem a seco e moagem a úmido. Os usos industriais de milho incluem a produção de etanol, amido de milho em indústria de moagem a úmido e farinha de milho na indústria de moagem a seco. As aplicações industriais de amido de milho e farinha são baseadas nas suas propriedades funcionais, incluindo, por exemplo, viscosidade, formação de filme, propriedades adesivas e capacidade de suspender partículas. O amido e farinha de milho têm aplicação nas indústrias de papel e têxteis, e também são usados em adesivos, materiais de construção, ligantes de fundição, amidos para lavanderia, explosivos, lamas de moinho-a-óleo, e outras aplicações em mineração.

Muitas plantas de cultivo, incluindo arroz, milho, tomate, e melão são crescidos como híbridos, os quais apresentam maior vigor e qualidades melhoradas em comparação com as plantas parentais. O desenvolvimento de

híbridos em um programa de melhoramento de plantas requer, em geral, o desenvolvimento de linhagens endogâmicas homozigotas, o cruzamento dessas linhagens e a avaliação dos produtos de cruzamento. Os métodos de melhoramento de pedigree e de melhoramento por seleção recorrente são usados para desenvolver linhagens endogâmicas a partir de populações de melhoramento. Por exemplo, os programas de melhoramento da planta de milho combinam os *backgrounds* genéticos de duas ou mais linhagens endogâmicas (ou várias outras fontes de germoplasma) em *pools* de melhoramento, a partir dos quais novas linhagens endogâmicas são desenvolvidas por auto-polinização (auto-fecundação) e seleção dos fenótipos desejados. As endogâmicas selecionadas são depois cruzadas com outras linhagens endogâmicas e os híbridos desses cruzamentos são avaliados para se determinar quais daqueles possuem potencial comercial. Como tal, o melhoramento de planta e o desenvolvimento de híbrido são processos caros e demorados.

O melhoramento de pedigree se inicia com o cruzamento de dois genótipos, cada um dos quais pode ter uma ou mais características desejáveis que esteja faltando na outra ou que complementa a outra. Se os dois parentais originais não fornecerem todas as características desejadas, outras fontes podem ser incluídas na população de melhoramento. Usando este método, plantas superiores são selecionadas e auto-fecundadas em sucessivas gerações até serem obtidas linhagens homogêneas de planta. O melhoramento por seleção recorrente, tal como o retrocruzamento, pode ser usado para

melhorar uma linhagem endogâmica e uma híbrida pode ser feita usando as endogâmicas. O retrocruzamento pode ser usado para transferir um caractere específico desejado a partir de uma endogâmica ou fonte para uma segunda endogâmica na qual está ausente aquele caractere, por exemplo, por meio de um primeiro cruzamento de uma endogâmica superior (parental recorrente) ou uma endogâmica doadora (parental não-recorrente) que porta o gene (ou genes) apropriado para o caractere em questão, cruzamento da progênie do primeiro retrocruzamento com relação ao parental recorrente superior, e selecionar, na progênie resultante, o caractere desejado para ser transferido de um parental não-recorrente. Após cinco ou mais gerações de retrocruzamento com a seleção do caractere desejado, a progênie é homozigota com relação aos lócus que controlam a característica que está sendo transferida, e é semelhante ao parental superior com relação essencialmente a todos os outros genes. A última geração de retrocruzamento é auto-fecundada para dar a progênie pura de melhoramento com relação ao gene que está sendo transferido.

Um híbrido de cruzamento simples (F1) resulta do cruzamento de duas linhagens endogâmicas (P1 e P2), cada uma das quais possui um genótipo que complementa o genótipo do outro. No desenvolvimento de híbridos comerciais em um programa de melhoramento de planta de milho, por exemplo, somente as plantas híbridas F1 são buscadas, na medida que elas são mais vigorosas do que seus parentais endogâmicos. Este vigor híbrido (heterose) pode ser manifestado em

muitos caracteres poligênicos, tal como crescimento vegetativo aumentado e produtividade aumentada. O desenvolvimento de um híbrido em um programa de melhoramento de planta de milho, por exemplo, envolve a seleção de plantas de vários *pools* de germoplasma para cruzamentos de melhoramento iniciais; a autofecundação das plantas selecionadas a partir dos cruzamentos de melhoramento com relação a diversas gerações para produzir uma série de linhagens endogâmicas, as quais, apesar de diferentes uma da outra, melhoram verdadeiramente e são altamente uniformes; e o cruzamento das linhagens endogâmicas selecionadas com as diferentes linhagens endogâmicas para produzir a progênie híbrida F1. Durante o processo de endogamia em milho, o vigor das linhagens decresce, mas é restaurado quando duas diferentes linhagens endogâmicas são cruzadas para produzir as plantas híbridas. Uma importante conseqüência da homozigosidade e homogeneidade das linhagens endogâmicas é que o híbrido F1, entre um par definido de plantas parentais endogâmicas, sempre é o mesmo. Como tal, uma vez que as endogâmicas que fornecem um híbrido superior tenham sido identificadas, a semente do híbrido pode ser reproduzida indefinidamente tanto quanto os parentais endogâmicos sejam mantidos.

A produção de semente híbrida requer a eliminação ou inativação de pólen produzido pelo parental feminino. A remoção ou inativação incompleta do pólen provê o potencial para auto-fecundação, aumentando o risco de que a semente inadvertidamente auto-polinizada seja não-intencionalmente

colhida e embalada com semente híbrida. Uma vez que a semente seja plantada, as plantas auto-fecundadas podem ser identificadas e selecionadas; as plantas auto-fecundadas são geneticamente equivalentes à linhagem endogâmica feminina usada para produzir o híbrido. Tipicamente, as plantas auto-fecundadas são identificadas e selecionadas com base no seu reduzido vigor. Por exemplo, plantas de milho auto-fecundadas femininas são identificadas por sua aparência menos vigorosa com relação às características vegetativas e/ou reprodutivas, incluindo planta de menor altura, espiga de pequeno tamanho, forma de espiga e grão, cor do sabugo ou outras características. As linhagens auto-fecundadas também podem ser identificadas usando análise com marcador molecular (ver, por exemplo, Smith e Wych, (1995) *Seed Sci. Technol.* 14:1-8). Usando tais métodos, a homozigosidade da linhagem auto-polinizada pode ser verificada pela análise da composição alélica em vários lócus no genoma.

Em virtude de as plantas híbridas serem importantes e valiosas culturas de campo, os melhoristas de plantas estão continuamente trabalhando para desenvolver híbridos de alta produtividade que sejam agronomicamente sãos com base em linhagens endogâmicas estáveis. A disponibilidade de tais híbridos permite que uma quantidade máxima de cultura seja produzida com os *inputs* usados, enquanto se minimiza a susceptibilidade a pragas e estresses ambientais. Para se alcançar essa meta, o melhorista de plantas precisa desenvolver linhagens parentais endogâmicas superiores para

produzir híbridos mediante a identificação e seleção de indivíduos geneticamente únicos que ocorrem em uma população segregante. A presente invenção contribui para essa meta, por exemplo, pelo provimento de plantas que, quando cruzadas, geram progênie estéril masculina a qual pode ser usada como plantas parentais femininas para gerar plantas híbridas.

Um grande número de genes tem sido identificado como sendo pendão-preferido em seu padrão de expressão pelo uso de métodos tradicionais e mais recentemente de métodos de alta produção(*high-throughput methods*). A correlação de função desses genes com importantes processos bioquímicos ou de desenvolvimento que finalmente levam a pólen fértil é árduo quando as abordagens ficam limitadas à análise clássica de mutação genética a jusante (*forward*) ou reversa. Como aqui revelado, as abordagens de repressão em milho fornecem meios alternativos rápidos para identificar genes que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de pólen em milho. O gene de fertilidade masculina de milho bem-caracterizado, MS45, e diversos genes antera-preferidos de função desconhecida foram usados para avaliar a eficácia de se gerar esterilidade masculina usando aboragens de silenciamento de gene pós-transcrição (PTGS; ver, por exemplo, Kooter et al (1999) Trends Plant Sci. 4:340-346) ou de silenciamento de gene em transcrição (TGS; ver, por exemplo, Mette et al (2000) EMBO J 19:5194-5201).

Para examinar o PTGS, foram introduzidos em milho constructos RNAi contendo *hairpin* que possuem estruturas de caule compostas de repetições invertidas de seqüências de cDNA antera-expressadas, e uma volta (*loop*) contendo tanto uma seqüência codificante não-homóloga como um intron entrelaçável (*splicable intron*) de milho.

Para examinar TGS, como uma abordagem para desligar (*knock out*) a função do gene de antera, foi gerado um segundo conjunto de constructos nos quais os promotores de seqüências de gene antera-específico formaram o caule e uma seqüência não-homóloga formou o *loop*. Os constructos foram expressados usando promotores constitutivos e promotores antera-preferidos.

Foram observados fenótipos de fertilidade contrastantes, dependendo do tipo de constructo de *hairpin* expressado. As plantas expressando os constructos PTGS ficaram férteis masculinas. Em contraste, as plantas expressando os constructos TGS ficaram estéreis masculinas, e com ausência do mRNA do MS45 e proteína. Adicionalmente, o fenótipo de esterilidade das plantas contendo o hpRNA específico para o promotor do MS45 (ou seja, os constructos TGS) foi revertido quando o MS45 foi expressado a partir de promotores heterólogos nessas plantas. Esses resultados demonstram que o TGS provê um instrumento para rapidamente correlacionar a expressão do gene com a função de genes

desconhecidos tais como os genes de monocotiledôneas antera-expressados.

Conseqüentemente, a invenção provê pares de plantas parentais, em que as plantas compreendendo o par de parentais para melhoramento são férteis (ou seja, fértil masculina e fértil feminina), e em que a progênie produzida pelo cruzamento do par de plantas parentais são estéreis (ou seja, estéril masculina). Como aqui revelado, um par de plantas parentais da invenção pode incluir, por exemplo, uma primeira planta tendo um primeiro gene de fertilidade endógeno inativado, sendo que a primeira planta é fértil; e uma segunda planta tendo um segundo gene de fertilidade endógeno inativado, sendo que a segunda planta é fértil. Um tal par de plantas parentais é caracterizado, em parte, pelo fato de que se o primeiro gene de fertilidade endógeno for um gene de fertilidade masculina, então o segundo gene de fertilidade endógeno também é um gene de fertilidade masculina; enquanto que se o primeiro gene de fertilidade endógeno for um gene de fertilidade feminina, então o segundo gene de fertilidade endógeno também é um gene de fertilidade feminina. Os métodos da invenção podem ser concretizados para impactar na fertilidade do macho, da fêmea, ou em outros traços como listados em outros trechos deste, incluindo eficiência fotossintética e arquitetura da planta.

Como aqui usado, o termo "endógeno", quando usado com referência a um gene, significa um gene que está normalmente presente no genoma de células de um organismo especificado, e está presente em seu estado normal nas células (ou seja, presente no genoma no estado no qual ele normalmente está presente na natureza). O termo "exógeno" é aqui usado para se referir a qualquer material que está introduzido em uma célula. O termo "molécula de ácido nucléico exógeno" ou "transgene" se refere a qualquer molécula de ácido nucléico que tanto é aquele que não está normalmente presente em um genoma de célula como é aquele que é introduzido em uma célula. Tais moléculas de ácido nucléico exógeno, em geral, são moléculas de ácido nucléico recombinante, as quais são geradas usando-se métodos de DNA recombinante, como aqui discutido ou de outra forma conhecidos do estado da técnica. Em várias concretizações, um organismo transgênico não-humano, como aqui revelado, pode conter, por exemplo, um primeiro transgene e um segundo transgene. Tais primeiro e segundo transgenes podem ser introduzidos em uma célula, por exemplo, uma célula progenitora de um organismo transgênico, tanto como moléculas individuais de ácido nucléico ou como uma unidade simples (por exemplo, contida em vetores diferentes ou contida em um único vetor, respectivamente). Em qualquer dos casos, pode ser feita a confirmação de que uma célula da qual o organismo transgênico é derivado contém ambos os transgenes usando-se métodos rotineiros e bem-conhecidos, tais como a expressão de genes de marcador ou hibridização de ácido nucléico ou análise de PCR. Alternativamente, ou

adicionalmente, a confirmação da presença de transgenes pode ocorrer mais tarde, por exemplo, após a regeneração de uma planta a partir de uma célula putativamente transformada.

Um gene de fertilidade endógeno de uma planta de um par de plantas parentais da invenção pode ser inativada devido, por exemplo, (1) a uma mutação do gene endógeno de modo que a função de um produto codificado pelo gene é reprimida (por exemplo, o produto de gene não é expressado ou é expressado a um nível que é insuficiente para mediar seu efeito completo na planta ou célula de planta; ou (2) para a expressão de uma molécula de ácido nucléico exógeno que reduz ou inibe a expressão do produto de gene codificado pelo gene endógeno. Como tal, o termo "inativado" é aqui usado de forma ampla para se referir a qualquer manipulação de um gene endógeno, ou de uma célula contendo o gene, de modo que a função mediada por um produto codificado pelo gene é reprimida. Adicionalmente, deve ser reconhecido que, independente do fato de o gene endógeno inativado ter a atividade reduzida ou se ele é completamente inativo, é mantido o fenótipo relevante desejado. Como tal, a referência a um gene de fertilidade masculina inativado em uma planta parental definida como tendo um fenótipo fértil masculino pode incluir, por exemplo, um gene de fertilidade masculina que é expressado a um nível que é mais baixo do que o normal, mas suficiente para manter a fertilidade da planta parental, ou um gene de fertilidade masculina que é completamente inativo, e em que

a fertilidade da planta parental é mantida devido à expressão de um segundo produto de gene.

A mutação de um gene endógeno que resulta na repressão da função do gene pode ser afetada, por exemplo, por deleção ou inserção de um ou alguns nucleotídeos na seqüência de nucleotídeos do gene (por exemplo, no promotor, seqüência codificante, ou intron), pela substituição de um ou alguns nucleotídeos no gene por outros nucleotídeos diferentes, ou pelo desligamento (*knocking out*) do gene (por exemplo, por recombinação homóloga usando um vetor apropriado de alvo). As plantas tendo tais mutações em ambos os alelos podem ser obtidas, por exemplo, usando-se métodos de cruzamento como aqui revelados ou de outra forma conhecidos do estado da técnica. A inativação de um gene endógeno que resulta na repressão da função do gene também pode ser efetuada pela introdução nas células do gene endógeno ou um produto expressado a partir do gene endógeno (por exemplo, um polipeptídeo codificado), ou um transgene que codifica um produto (por exemplo, um RNA) que reprime a expressão do gene endógeno ou de um produto codificado pelo gene endógeno em células da planta nas quais o gene normalmente é expressado.

A título de exemplo, a inativação de genes de fertilidade endógenos pode ser efetuada pela expressão de moléculas de RNA *hairpin* (hpRNA) em células dos órgãos

reprodutores de uma planta (por exemplo, células de estame onde os genes de fertilidade endógenos a serem inativados são genes de fertilidade masculina). O estame, que compreende o órgão reprodutor masculino de plantas, inclui vários tipos de célula, incluindo, por exemplo, o estilo-estigma, antera, *tapetum* e pólen. Os hpRNAs utilizáveis para as finalidades da presente invenção são desenhados para incluir repetições invertidas de um promotor do gene endógeno a ser inativado; os hpRNAs tendo a capacidade de reprimir a expressão de um gene têm sido descritos (ver, por exemplo, Matzke et al (2001) *Curr. Opin. Genet. Devel.* 11:221-227; Scheid et al (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 99:13659-13662; Waterhouse e Helliwell (2003) Nature Reviews Genetics 4:29-38; Aufsaftz et al (2002) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 99(4):16499-16506; Sijen et al., (2001) Curr. Biol. 11:436-440). Como aqui revelado, o uso de promotores estame-específicos ou estame-preferidos, incluindo promotores antera-específicos, promotores pólen-específicos, promotores *tapetum*-específicos e semelhantes permite a expressão de hpRNAs em plantas (particularmente em células reprodutoras masculinas), sendo que o hpRNA reprime a expressão de um gene de fertilidade endógeno, e por esse meio inativando a expressão do gene de fertilidade endógeno. Como tal, a repressão usando um hpRNA específico com relação a um promotor que dirige a expressão de um gene de fertilidade provê meios para inativar um gene de fertilidade endógeno.

Em uma concretização, um par de plantas parentais da invenção pode incluir uma primeira planta, a qual contém uma primeira molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um primeiro hpRNA, sendo que o primeiro hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma repetição invertida do promotor do primeiro gene de fertilidade endógeno, e em que, sob expressão, o primeiro hpRNA reprime a expressão do primeiro gene de fertilidade endógeno; e uma segunda planta, a qual contém uma segunda molécula de ácido nucléico exógeno compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um segundo hpRNA, em que o segundo hpRNA compreende uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma repetição invertida do promotor do segundo gene de fertilidade endógeno, e em que, sob expressão, o segundo hpRNA reprime a expressão do segundo gene de fertilidade endógeno. De acordo com a presente invenção, o primeiro e/ou segundo ácido nucléico exógeno pode, mas não precisa, estar estavelmente integrado no genoma das células da primeira e/ou segunda planta, respectivamente. Tais primeira e segunda plantas do par de plantas parentais são caracterizadas, em parte, pelo fato de que cada uma é fértil, e ainda é caracterizada pelo fato de que, quando cruzada, a progênie de tal cruzamento é estéril (por exemplo, estéril masculina).

Os termos "primeiro", "segundo", "terceiro" e "quarto" são aqui usados somente para esclarecer as relações das várias células e moléculas ou para distinguir diferentes tipos de uma molécula, e, a menos que seja especificamente indicado de modo diferente, não se tem intenção de indicar qualquer ordem, importância ou aspecto quantitativo. Por exemplo, e, a menos que seja especificamente indicada de modo diferente, a referência a uma "primeira" planta contendo um "primeiro gene endógeno" tem a intenção de indicar somente que o gene especificado está presente na planta especificada. A título de um segundo exemplo, e, a menos que seja especificamente indicada de modo diferente, a referência a uma "primeira planta contendo um primeiro transgene e um segundo transgene" tem a intenção de indicar somente que a dita planta contém duas moléculas de ácido nucléico exógeno que são diferentes uma da outra.

Como aqui usado, o termo "molécula de ácido nucléico" ou "polinucleotídeo" ou "seqüência de nucleotídeos" se refere, de forma ampla, a uma seqüência de dois ou mais desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos que estão ligados um ao outro por uma ligação fosfodiéster. Como tal, os termos incluem RNA e DNA, os quais podem ser um gene ou uma parte dele, um cDNA, uma seqüência sintética de ácido polidesoxirribonucléico, ou semelhante, e pode ser de simples-fita ou de dupla-fita, bem como um híbrido de DNA/RNA. Além disso, os termos são aqui usados para incluir moléculas de ácido nucléico de ocorrência natural, as quais podem ser isoladas de uma célula, assim como, moléculas

sintéticas, as quais podem ser preparadas, por exemplo, por métodos de síntese química ou por métodos enzimáticos tal como pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O termo "recombinante" é aqui usado para se referir a uma molécula de ácido nucléico que é manipulada fora de uma célula, incluindo duas ou mais seqüências heterólogas de nucleotídeos ligadas. O termo "heterólogo" é aqui usado para se referir a uma seqüência de nucleotídeos os quais não estão normalmente ligados na natureza ou, se ligados, estão ligados em uma maneira diferente daquela revelada. Por exemplo, uma referência a um transgene compreendendo uma seqüência codificante operacionalmente ligada a um promotor heterólogo significa que o promotor é um que normalmente não dirige a expressão da seqüência de nucleotídeos em uma célula especificada na natureza.

Em geral, os nucleotídeos compreendendo uma molécula de ácido nucléico exógeno (transgene) são desoxirribonucleotídeos de ocorrência natural, tais como adenina, citosina, guanina ou timina ligados a 2´-desoxirribose, ou ribonucleotídeos tais como adenina, citosina, guanina ou uracila ligados a ribose. Entretanto, uma molécula de ácido nucléico ou seqüência de nucleotídeos também pode conter análogos de nucleotídeo, incluindo nucleotídeos sintéticos que não ocorrem na natureza. Tais análogos de nucleotídeo são bem conhecidos no estado da técnica e estão disponíveis comercialmente, como o são os polinucleotídeos contendo tais análogos de nucleotídeo (Lin et al., *Nucl. Acids Res.* 22:5220-5234, 1994; Jellinek et

al., (1995) *Biochemistry* 34:11363-11372,; Pagratis et al., (1997) *Nature Biotechnol.* 15:68-73,). De forma semelhante, a ligação covalente unindo os nucleotídeos de uma seqüência de nucleotídeos, em geral, é uma ligação fosfodiéster, mas também pode ser, por exemplo, uma ligação tiodiéster, uma ligação fosforotioato, uma ligação semelhante à peptídica ou qualquer outra ligação conhecida daqueles especialistas na técnica como utilizáveis para ligar nucleotídeos para produzir polinucleotídeos sintéticos (ver, por exemplo, Tam et al., (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:977-986,; Ecker e Crooke, (1995) *BioTechnology* 13:351360,). A incorporação de análogos de nucleotídeos que não ocorrem na natureza ou de ligações unindo os nucleotídeos ou análogos podem ser particularmente utilizáveis quando a molécula de ácido nucléico é para ser exposta a um ambiente que pode conter uma atividade nucleolítica, incluindo, por exemplo, um meio de cultura de tecido de planta ou em uma célula de planta, desde que as moléculas modificadas possam ser susceptíveis à degradação.

Uma seqüência de nucleotídeos contendo nucleotídeos de ocorrência natural e ligações fosfodiéster podem ser quimicamente sintetizadas ou podem ser produzidas usando métodos de DNA recombinante, usando, como *template*, um polinucleotídeo apropriado. Em comparação, uma seqüência de nucleotídeos contendo análogos de nucleotídeo ou ligações covalentes diferentes de ligações fosfodiéster, em geral, é sintetizada quimicamente, apesar de que uma enzima tal como a T7 polimerase pode incorporar certos tipos de análogos de

nucleotídeo em um polinucleotídeo e, portanto, pode ser usada para produzir um tal polinucleotídeo recombiantemente a partir de um *template* apropriado (Jellinek et al., acima mencionado, 1995).

Uma molécula de ácido nucléico exógeno pode compreender seqüências de nucleotídeos operacionalmente ligadas, tal como um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um hpRNA, ou um promotor ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um produto de gene de fertilidade masculina. O termo "operacionalmente ligado" é aqui usado para se referir a duas ou mais moléculas que, quando juntadas uma à outra, geram uma molécula que compartilha aspectos característicos de cada uma das moléculas individuais. Por exemplo, quando usado com referência a um promotor (ou outro elemento de regulação) e uma segunda seqüência de nucleotídeos codificante de um produto de gene, o termo "operacionalmente ligado" significa que o elemento de regulação está posicionado com relação à segunda seqüência de nucleotídeos de maneira que a transcrição ou tradução da seqüência de nucleotídeos isolada está sob a influência do elemento de regulação. Quando usado com relação a uma proteína de fusão compreendendo um primeiro polipeptídeo e um ou mais polipeptídeos adicionais, o termo "operacionalmente ligado" significa que cada componente do polipeptídeo da proteína de fusão (quimérica) apresenta algo ou o todo de uma função que é característica do componente de poplipeptídeo (por exemplo, um domínio de

localização de compartimento de célula e uma atividade enzimática). Em um outro exemplo, duas seqüências de nucleotídeos operacionalmente ligadas, cada uma das quais codifica um polipeptídeo, pode ser tal que as seqüências codificantes estão em quadro e, portanto, sob transcrição e tradução, resultam na produção de dois polipeptídeos, os quais podem ser dois polipeptídeos separados ou uma proteína de fusão.

Quando uma molécula de ácido nucléico exógeno inclui um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos codificante de um RNA ou polipeptídeo de interesse, a molécula de ácido nucléico exógeno pode ser referida como uma molécula de ácido nucléico exógeno expressável (ou transgene). O termo "expressável" é aqui usado porque, apesar de uma tal seqüência de nucleotídeos poder ser expressada a partir do promotor, ela não precisa necessariamente, na verdade, ser expressada em um ponto particular no tempo. Por exemplo, quando um promotor de um transgene expressável for um promotor induzível em que falta a atividade básica, uma seqüência de nucleotídeos operacionalmente ligada codificante de um RNA ou polipeptídeo de interesse é expressado somente em seguida à exposição a um agente de indução apropriado.

Os promotores de transcrição, em geral, atuam de uma maneira posição- e orientação-dependente, e usualmente estão posicionados em ou no seio de cerca de cinco

nucleotídeos até cerca de cinqüenta nucleotídeos 5´(a montante) do sítio de início da transcrição de um gene na natureza. Em comparação, os *enhancers* podem atuar em uma maneira relativamente posição- ou orientação-independente, e podem estar posicionados diversas centenas ou milhares de nucleotídeos a montante ou a jusante do sítio de início da transcrição, ou em um intron dentro da região codificante de um gene, novamente ainda estando operacionalmente ligados à região codificante de modo a melhorar a transcrição. As posições e orientações relativas de vários elementos, adicionalmente a um promotor, incluindo o posicionamento de uma seqüência de regulação transcrita, tal como um sítio interno de entrada no ribossomo, ou um elemento de regulação traduzido, tal como um domínio de compartimentagem na célula em um quadro de leitura apropriado, são bem conhecidos e os métodos para ligar operacionalmente tais elementos são rotineiros no estado da técnica (ver, por exemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons, Baltimore MD 1987, e suplementos ao longo de 1995)).

Os promotores utilizáveis na expressão de uma molécula de ácido nucléico de interesse podem ser quaisquer dentre uma gama de promotores de ocorrência natural que são conhecidos como operativos em plantas ou animais, se desejado. Os promotores que dirigem a expressão em células de órgão reprodutor masculino ou feminino de uma planta são

utilizáveis para gerar uma planta transgênica ou par de plantas parentais da invenção. Os promotores utilizáveis na presente invenção podem incluir promotores constitutivos, os quais, em geral, são ativos na maioria ou em todos os tecidos de uma planta, promotores induzíveis, os quais, em geral, são inativos ou apresentam um baixo nível básico de expressão, e podem ser induzidos até uma atividade relativamente alta sob contato de células com um agente de indução apropriado, promotores tecido-específicos (ou tecido-preferidos), os quais, em geral, são expressados em somente um ou em uns poucos tipos particulares de célula (por exemplo, células de antera de planta); e promotores desenvolvimento- ou estágio-específicos, os quais são ativos somente durante um período definido durante o crescimento ou desenvolvimento de uma planta. Freqüentemente, os promotores podem ser modificados, se necessário, para variar o nível de expressão. Certas concretizações compreendem promotores exógenos com relação à espécie que está sendo manipulada. Por exemplo, o gene MS45 introduzido no germoplasma de milho ms45ms45 pode ser dirigido por um promotor isolado de uma outra espécie de planta; um constructo *hairpin* pode então ser desenhado para o alvo do promotor de planta exógeno, reduzindo a possibilidade de interação do *hairpin* com promotores de milho endógenos não-alvo.

Promotores constitutivos exemplificativos incluem o promotor do promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor (CaMV) (Odell *et al* (1985) *Nature* 313:810-812), o promotor

de ubiquitina de milho (Christensen *et al* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 e Christensen *et al* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); o promotor de núcleo do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos revelados no documento WO 99/43838 e patente US 6.072.050; actina de arroz (McElroy *et al* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); pEMU (Last *et al* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (patente US 5.659.026); promotor de actina de arroz (patente US 5.641.876; WO 00/70067), promotor de histona de milho (Brignon et al., (1993) Plant Mol Bio 22(6):1007-1015; Rasco-Gaunt et al., (2003) Plant Cell Rep. 21(6):569-576) e semelhantes. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, aqueles descritos nas patentes números US 5,608,144 e US 6,177,611, e documento PCT publicado WO 03/102198.

Os elementos de regulação tecido-específicos, tecido-preferidos ou estágio-específicos incluem, por exemplo, o elemento de regulação *AGL8/FRUITFULL*, o qual é ativado sob indução floral (Hempel et al., (1997) *Development* 124:3845-3853); elementos de regulação raiz-específicos, tais como os elementos de regulação oriundos do gene RCP1 e do gene LRP1 (Tsugeki e Fedoroff, (1999) *Proc. Natl. Acad., USA* 96:12941-12946; Smith e Fedoroff, (1995) *Plant Cell* 7:735-745); elementos de regulação flor-específicos tais como os elementos de regulação oriundos do gene *LEAFY* e do gene *APETALA1* (Blazquez et al., (1997) *Development* 124:3835-3844; Hempel et al., acima mencionado, 1997); elementos de regulação semente-específicos, tal como o elemento de

regulação oriundo do gene de oleosina (Plant et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 25:193-205), e elemento de regulação específico da zona de deiscência. Elementos de regulação adicionais tecido-específicos ou estágio-específicos incluem o promotor Zn13, o qual é um promotor pólen-específico (Hamilton et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:211-218); o promotor *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*), o qual é ativo em meristema de brotação apical; o promotor ativo em meristemas de brotação (Atanassova et al., (1992) *Plant J.* 2:291), o promotor cdc2 e o promotor cyc07 (ver, por exemplo, Ito et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:863-878; Martinez et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:7360); os promotores meristemático-preferidos meri-5 e H3 (Medford et al., (1991) *Plant Cell* 3:359; Terada et al., (1993) *Plant J.* 3:241); os promotores meristemático- e floema-preferidos dos genes Myb-relacionados em cevada (Wissenbach et al., (1993) *Plant J.* 4:411); cyc3aAt e cyc1At de *Arabidopsis* (Shaul *et al* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:4868-4872); CYS e CYM de ciclinas de *C. roseus* (Ito *et al* (1997) *Plant J.* 11:983-992); e CyclinB1 de *Nicotiana* (Trehin *et al* (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:667-672); o promotor do gene de *APETALA3*, o qual é ativo em meristemas florais (Jack et al., (1994) *Cell* 76:703; Hempel et al., acima mencionado, 1997); um promotor de um membro da família *agamous-like* (AGL), por exemplo, AGL8, a qual é ativa em meristema de brotação sob a transição para floração (Hempel et al., acima mencionado, 1997); promotores da zona de abscisão floral; promotores L1-específicos; o promotor de poligalacturonase de tomate de

amadurecimento-melhorado (Nicholass et al., (1995) Plant Mol. Biol. 28:423-435), o promotor E8 (Deikman et al., (1992) Plant Physiol. 100:2013-2017), e o promotor 2A1 fruta-específico 2A1, promotores U2 e U5 snRNA oriundos de milho, o promotor Z4 oriundo de um gene Z4 codificante da proteína zeína de 22 kD, o promotor Z10 de um gene codificante da proteína zeína de 10 kD, um promotor Z27 de um gene codificante da proteína zeína de 27 kD, o promotor A20 do gene codificante da proteína zeína de 19 kD, e semelhantes. Promotores tecido-específicos adicionais podem ser isolados usando métodos bem conhecidos (ver, por exemplo, patente número US 5.589.379). Promotores brotação-preferidos incluem os promotores de brotação meristema-preferidos tais como os promotores revelados em Weigel *et al* (1992) *Cell* 69:843-859 (No. de Acesso M91208); No. de Acesso AJ131822; No. de Acesso Z71981; No. de Acesso AF049870 e promotores brotação-preferidos revelados em McAvoy *et al* (2003) *Acta Hort. (ISHS)* 625:379-385. Os promotores inflorescência-preferidos incluem o promotor de chalcone sintase (Van der Meer *et al* (1992) *Plant J. 2(4):525-535*), antera-específico LAT52 (Twell *et al* (1989) *Mol. Gen. Genet. 217*:240-245), pólen-específico Bp4 (Albani *et al* (1990) *Plant Mol Biol.* 15:605), gene Zm13 pólen-específico de milho (Hamilton *et al* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:211-218; Guerrero et al (1993) *Mol. Gen. Genet.* 224:161-168), promotores micrósporo-específico tal como o promotor do gene apg (Twell et al., (1993) Sex. Plant Reprod. 6: 217-224), e promotores *tapetum*-específicos tal como o promotor do gene TA29 (Mariani et al., (1990) *Nature*

347:737; patente número US 6,372,967), e outros promotores estame-específicos tais como o promotor do gene MS45, o promotor do gene 5126, o promotor do gene BS7, o promotor do gene PG47 (US 5,412,085; US 5,545,546; Plant J 3(2):261-271 (1993)), o promotor do gene SGB6 (US 5,470,359), o promotor do gene G9 (US 5,8937,850; US 5,589,610), o promotor do gene SB200 (WO 02/26789), ou semelhantes (ver Exemplo 1). Os promotores tecido-específicos de interesse, ainda, incluem o gene SF3 pólen-expressado de couve-flor (Baltz *et al* (1992) *The Plant Journal 2*:713-721), genes pólen-específicos de *B. napus* (Arnoldo *et al* (1992) *J. Cell. Biochem*, Abstract No. Y101204). Os promotores tecido-preferidos, ainda, incluem aqueles relatados por Yamamoto *et al* (1997) *Plant J.* 12(2):255-265 (psaDb); Kawamata *et al* (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803 (PsPAL1); Hansen *et al* (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3):337-343 (ORF13); Russell *et al* (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168 (cera ou ZmGBS; zeína de 27kDa, ZmZ27; osAGP; osGT1); Rinehart *et al* (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341 (Fbl2A de algodão); Van Camp *et al* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535 (*Nicotiana* SodA1 e SodA2); Canevascini *et al* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524 (*Nicotiana* ltp1); Yamamoto *et al* (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778 (promoter cab-6 de *Pinus*); Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco *et al* (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138 (rubisco activase de espinafre (Rca)); Matsuoka *et al* (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590 (promotor PPDK); e Guevara-Garcia *et al* (1993) *Plant J.* 4(3):495-505 (promotor pmas de *Agrobacterium*). Um promotor tecido-

específico que é ativo em células de órgãos reprodutores masculino e feminino podem ser particularmente utilizáveis em certos aspectos da presente invenção.

Os promotores "semente-preferidos" incluem ambos promotores "semente-específicos" (aqueles promotores ativos durante o desenvolvimento da semente, tais como os promotores de proteínas de reserva de semente), assim como os promotores de "germinação-de-semente" (aqueles promotores ativos durante a germinação da semente), ver Thompson *et al* (1989) *BioEssays* 10:108. Tais promotores semente-preferidos incluem, mas não ficam limitados a, Cim1 (mensagem citocinina-induzida), cZ19B1 (zeína de milho de 19 kDa), mi1ps (mio-inositol-1-fosfato sintase), ver WO 00/11177 e patente número US 6.225.529. A gamma-zeína é um promotor endosperma-específico. A globulina-1 (Glob-1) é um promotor representativo embrião-específico. Para dicotiledôneas, os promotores semente-específicos incluem, mas não estão limitados a, β-faseolina de feijão, napin, β-conglicinina, lecitina de soja, cruciferin, e semelhantes. Para monocotiledôneas, os promotores semente-específicos incluem, mas não estão limitados a, zeína de milho de 15 kDa, zeína de 22 kDa, zeína de 27 kDa, gama-zeína, *waxy*, *shrunken* 1, *shrunken* 2, globulina 1, etc. Ver também WO 00/12733 e patente US 6.528.704, onde são revelados os promotores semente-preferidos oriundos dos genes *end1* e *end2*. Promotores embrião-específicos adicionais estão revelados em Sato *et al* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8117-8122 (arroz *homeobox*, OSH1); e Postma-Haarsma *et al*

(1999) *Plant Mol. Biol.* 39:257-71 (genes KNOX de arroz). Promotores endosperma-específicos adicionais estão revelados em Albani *et al* (1984) *EMBO* 3:1405-15; Albani *et al* (1999) *Theor. Appl. Gen.* 98:1253-62; Albani *et al* (1993) *Plant J.* 4:343-55; Mena *et al* (1998) *The Plant Journal* 116:53-62 (cevada DOF); Opsahl-Ferstad *et al* (1997) *Plant J* 12:235-46 (milho Esr); e Wu *et al* (1998) *Plant Cell Physiology* 39:885-889 (arroz GluA-3, GluB-1, NRP33, RAG-1).

Um elemento de regulação induzível é aquele que é capaz de ativar, direta ou indiretamente, a transcrição de uma ou mais seqüências de DNA ou genes em resposta a um indutor. O indutor pode ser um agente químico tal como uma proteína, metabólito, regulador de crescimento, herbicida ou composto fenólico; ou um estresse fisiológico, tal como aquele imposto diretamente por calor, frio, sal, ou elementos tóxicos, ou indiretamente pela ação de um patógeno ou agente de doença tal como um vírus; ou outro agente biológico ou físico ou condição ambiental. Uma célula de planta contendo um elemento de regulação induzível pode ser exposto a um indutor pela aplicação do indutor, externamente à célula ou planta, tal como por borrifamento, irrigação, aquecimento ou métodos semelhantes. Um agente de indução útil para induzir a expressão a partir de um indutor induzível é selecionado com base no elemento induzível de regulação particular. Em resposta à exposição a um agente de indução, a transcrição a partir do elemento de regulação induzível, em geral, é iniciado pela primeira vez ou é aumentada acima de um nível

de expressão basal ou constitutiva. Tipicamente, está presente o fator de proteína que se liga especificamente a um elemento de regulação induzível para ativar a transcrição em uma forma inativa, a qual é, então, direta ou indiretamente convertida para a forma ativa pelo indutor. Qualquer promotor induzível pode ser usado na presente invenção (ver Ward et al., (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 361-366).

Exemplos de elementos de regulação induzíveis incluem um elemento de regulação de metalotioneina, um elemento de regulação cobre-induzível, ou um elemento de regulação tetraciclina-induzível, a transcrição dos quais pode ser efetuada em resposta a íons de metal divalente, cobre ou tetraciclina, respectivamente (Furst et al., (1988) *Cell* 55:705-717; Mett et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:4567-4571; Gatz et al., (1992) *Plant J.* 2:397-404; Roder et al., (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243:32-38). Elementos de regulação induzíveis também incluem um elemento de regulação de *ecdysone* ou um elemento de regulação de glucocorticóide, a transcrição dos quais pode ser efetuada em resposta a *ecdysone* ou outro esteróide (Christopherson et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:6314-6318; Schena et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88:10421-10425; patente US 6.504.082); um elemento de regulação responsivo a frio ou um elemento de regulação por choque térmico, a transcrição dos quais pode ser efetuada em resposta à exposição a frio ou calor, respectivamente (Takahashi et al., (1992) *Plant Physiol.* 99:383-390); o

promotor do gene de álcool desidrogenase (Gerlach et al., (1982) PNAS USA 79:2981-2985; Walker et al., (1987) PNAS 84(19):6624-6628), induzível por condições anaeróbias; e o promotor luz-induzível derivado do gene rbcS de ervilha ou o gene psaDb de ervilha (Yamamoto *et al* (1997) *Plant J.* 12(2):255-265); um elemento de regulação luz-induzível (Feinbaum et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 226:449,; Lam e Chua, (1990) *Science* 248:471,; Matsuoka *et al* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; Orozco *et al* (1993) *Plant Mol. Bio.* 23(6):1129-1138), um elemento de regulação induzível por hormônio de planta (Yamaguchi-Shinozaki et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:905; Kares et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:225), e semelhantes. Como elemento de regulação induzível também pode ser um promotor do gene In2-1 ou In2-2 de milho, o qual responde a antídotos (*safeners*) do herbicida benzenossulfonamida (Hershey et al., (1991) *Mol. Gen. Gene.* 227:229-237,; Gatz et al., (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243:32-38), e o repressor Tet do transposon Tn10 (Gatz et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237). Os promotores induzíveis por estresse incluem os promotores estresse sal/água-induzíveis tal como o P5CS (Zang *et al* (1997) *Plant Sciences 129*:81-89); os promotores frio-induzíveis tal como, cor15a (Hajela *et al* (1990) *Plant Physiol. 93*:1246-1252), cor15b (Wlihelm *et al* (1993) *Plant Mol Biol 23*:1073-1077), wsc120 (Ouellet *et al* (1998) *FEBS Lett.* 423-324-328), ci7 (Kirch *et al* (1997) *Plant Mol Biol. 33*:897-909), ci21A (Schneider *et al* (1997) *Plant Physiol. 113*:335-45); promotores seca-induzíveis tal como, Trg-31 (Chaudhary *et al* (1996) *Plant Mol. Biol. 30*:1247-57), rd29

(Kasuga *et al* (1999) *Nature Biotechnology 18*:287-291); promotores osmose-induzíveis, tal como Rab17 (Vilardell *et al* (1991) *Plant Mol. Biol. 17*:985-93) e osmotina (Raghothama *et al* (1993) *Plant Mol Biol 23*:1117-28); e promotores calor-induzíveis, tais como as proteínas de choque por calor (Barros *et al* (1992) *Plant Mol. 19*:665-75; Marrs *et al* (1993) *Dev. Genet. 14*:27-41), smHSP (Waters *et al* (1996) *J. Experimental Botany 47*:325-338), e o elemento induzível por choque-por-calor oriundo do promotor de ubiquitina *parsley* (WO 03/102198). Outros promotores estresse-induzíveis incluem rip2 (patente US 5.332.808 e pedido de patente US 2003/0217393) e rd29a (Yamaguchi-Shinozaki *et al* (1993) *Mol. Gen. Genetics 236*:331-340). Certos promotores são induzíveis por ferimento, incluindo o promotor pmas de *Agrobacterium* (Guevara-Garcia *et al* (1993) *Plant J.* 4(3):495-505) e o promotor ORF13 de *Agrobacterium* (Hansen *et al.*, (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343).

Elementos de regulação adicionais ativos em células de planta e úteis nos métodos ou composições da invenção incluem, por exemplo, o elemento de regulação do gene da nitrito redutase de espinafre (Back et al., *Plant Mol. Biol.* 17:9, 1991); um promotor de gama zeina, um promotor ole16 de oleosina, um promotor de globulina I, um promotor de actina I, um promotor de actina c1, um promotor de sacarose sintetase, um promotor de INOPS, um promotor de EXM5, um promotor de globulin2, um promotor de b-32, ADPG-pirofosforilase, um promotor de LtpI, um promotor de Ltp2, um promotor ole17 de oleosina, um promotor ole18 de

oleosina, um promotor de actin 2, um promotor de proteína pólen-específica, um promotor do gene de pectato liase pólen-específico ou promotor do gene PG47, um promotor do gene RTS2 antera-específico, promotor do gene SGB6, ou promotor do gene G9, um promotor do gene RAB24 *tapetum*-específico, um promotor da subunidade alfa da antranilato sintase, um promotor da zeina alfa, um promotor da subunidade beta da antranilato sintase, um promotor da di-hidrodipicolinato sintase, um promotor Thi 1, um promotor da álcool desidrogenase, um promotor de ligação *cab* a proteína, um promotor H3C4, um promotor da enzima de ramificação de amido RUBISCO SS, um promotor actin3, um promotor actin7, um promotor da proteína de regulação GF14-12, um promotor ribossômico da proteína L9, um promotor da enzima biossintética de celulose, um promotor da S-adenosil-L-homocisteina hidrolase, um promotor da superóxido dismutase, um promotor do receptor C-quinase, um promotor da fosfoglicerato mutase, um promotor de mRNA raiz-especifico RCc3, um promotor da glicose-6 fosfato isomerase, um promotor da pirofosfato-frutose 6-fosfato-1-fosfotransferase, promotor da beta-cetoacil-ACP sintase, um promotor de fotosistema 11 de 33 kDa, um promotor da proteína de desprendimento de oxigênio, um promotor da subunidade ATPase vacuolar de 69 kDa, um promotor da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, um promotor da proteína semelhante a induzível por ABA e amadurecimento, um promotor da fenilalanina amônia liase, um promotor da adenosina trifosfatase S-adenosil-L-homocisteina hidrolase, um promotor da chalcone sintase, um promotor de zeina, um

promotor de globulina-1, um promotor de proteína de ligação a auxina, um promotor do gene de UDP glicose flavonóide glicosil-transferase, um promotor NTI, um promotor de actina, e um promotor de *opaque* 2.

Uma molécula de ácido nucléico exógeno pode ser introduzida em uma célula como uma molécula de DNA livre, pode ser incorporada em uma matriz tal como um lipossoma ou uma partícula tal como uma partícula viral, ou pode ser incorporada em um vetor. A incorporação de um polinucleotídeo em um vetor pode facilitar a manipulação do polinucleotídeo, ou a introdução do polinucleotídeo em uma célula de planta. Conseqüentemente, o vetor pode ser derivado de um plasmídeo ou pode ser um vetor viral tal como um vetor T-DNA (Horsch et al., (1985) *Science* 227:1229-1231). Se desejado, o vetor pode incluir componentes de um elemento transponível de planta, por exemplo, um transposon Ds (Bancroft and Dean, (1993) *Genetics* 134:1221-1229) ou um transposon Spm (Aarts et al., (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247:555-564). Além de conter o transgene de interesse, o vetor também pode conter várias seqüências de nucleotídeos que facilitam, por exemplo, o resgate do vetor a partir de uma célula de planta transformada; passagem do vetor em uma célula hospedeira, a qual pode ser uma célula hospedeira de planta, animal, bactéria ou inseto; ou expressão de uma seqüência de nucleotídeos codificante no vetor, incluindo o todo ou uma parte de uma região codificante resgatada. Como tal, um vetor pode conter qualquer um dentre inúmeros elementos

adicionais de transcrição e tradução, incluindo promotores constitutivos e induzíveis, *enhancers*, e semelhantes (ver, por exemplo, Bitter et al., (1987) *Meth. Enzymol.* 153:516-544). Por exemplo, um vetor pode conter elementos utilizáveis na passagem, crescimento ou expressão em um sistema bacteriano, incluindo uma origem bacteriana de replicação; um promotor, o qual pode ser um promotor induzível; e semelhantes. Um vetor também pode conter um ou mais sítios de reconhecimento e clivagem de endonuclease de restrição, incluindo, por exemplo, uma seqüência *polilinker* para facilitar a inserção ou remoção de um transgene.

Adicionalmente a, ou alternativamente a, uma seqüência de nucleotídeos relevante com relação a um gene de fertilidade (por exemplo, um hpRNA compreendendo uma repetição invertida de um promotor de gene de fertilidade, ou uma seqüência codificante de um gene de fertilidade, sozinho ou operacionalmente ligado a um promotor heterólogo), uma molécula de ácido nucléico exógeno, ou um vetor contendo um tal transgene pode conter uma ou mais seqüências de nucleotídeos expressáveis codificantes de um RNA ou de um polipeptídeo de interesse. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos adicional pode codificar uma molécula de ácido nucléico antisense; uma enzima tal como β-galactosidase, β-glucuronidase, luciferase, alcalino fosfatase, glutatione α-transferase, cloranfenicol acetiltransferase, guanina xantina fosforribosil-transferase, e neomicina fosfotransferase; um polipeptídeo

viral ou uma porção do mesmo; ou um fator de crescimento de planta ou hormônio.

Em certas concretizações, o vetor de expressão contém um gene codificante de um marcador de seleção que está funcionalmente ligado a um promotor que controla a iniciação de transcrição. Para uma descrição geral de vetores de expressão em planta e genes repórter, ver Gruber *et al.*, "Vectors for Plant Transformation" em *Methods of Plant Molecular Biology and Biotechnology* 89-119 (CRC Press, 1993). Ao usar-se o termo, tem-se a intenção de incluir todos os tipos de marcadores de seleção, quer seja contabilizável (*scorable*) quer seja seletivo. A expressão de uma tal seqüência de nucleotídeos pode prover meios para a seleção de uma célula contendo o constructo, por exemplo, para conferir um fenótipo desejável a uma célula de planta contendo a seqüência de nucleotídeos. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos adicional pode ser, ou codificar, um marcador selecionável, o qual, quando presente ou expressado em uma célula de planta, provê meios para identificar a célula de planta contendo o marcador.

Um marcador selecionável provê meios para o *screening* de uma população de organismos ou células de um organismo (por exemplo, plantas ou células de planta) para identificar aqueles que possuem o marcador e, portanto, o transgene de interesse. Um marcador selecionável, em geral, confere uma vantagem seletiva à célula, ou ao organismo

(por exemplo, uma planta) contendo a célula, por exemplo, a capacidade de crescer na presença de um agente de seleção negativa, tal como um antibiótico ou, para uma planta, um herbicida. Uma vantagem seletiva também pode ser devida, por exemplo, a uma capacidade melhorada ou nova de utilizar um composto adicionado como um nutriente, fator de crescimento ou fonte de energia. Uma vantagem seletiva pode ser conferida por um único polinucleotídeo, ou seu produto de expressão, ou por uma combinação de polinucleotídeos cuja expressão em uma célula de planta fornece para a célula uma vantagem seletiva positiva, uma vantagem seletiva negativa, ou ambas. Deve ser reconhecido que a expressão do transgene de interesse (por exemplo, codificante de um hpRNA) também fornece meios para selecionar células contendo a seqüência de nucleotídeos codificante. Entretanto, o uso de um marcador selecionável adicional, o qual, por exemplo, permite que a célula de planta sobreviva sob condições diferentes tóxicas, fornece meios para enriquecer as células de planta transformadas contendo o transgene desejado. Exemplos de genes *scorable* ou de seleção conhecidos do estado da técnica podem ser encontrados em, por exemplo, Jefferson et al (1991) em *Plant Molecular Biology Manual*, ed. Gelvin et al (Kluwer Academic Publishers), pp. 1-33; DeWet et al., (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:725-737; Goff et al., (1990) *EMBO J.* 9:2517-2522; Kain et al., *BioTechniques* 19:650-655, 1995; e Chiu et al., (1996) *Curr. Biol.* 6:325-330.

Exemplos de marcadores selecionáveis incluem aqueles que conferem resistência a antimetabólitos, tais como herbicidas ou antibióticos, por exemplo, di-hidrofolato redutase, que confere resistência a metotrexato (Reiss, *Plant Physiol.* (Life Sci. Adv.) 13:143-149, 1994; ver também Herrera Estrella et al., (1983) *Nature* 303:209-213; Meijer et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-820); neomicina fosfotransferase, que confere resistência à aminoglicosideos neomicina, canamicina e paromicina (Herrera-Estrella, (1983) *EMBO J.* 2:987-995) e *hygro*, que confere resistência a higromicina (Marsh, (1984) *Gene* 32:481-485; ver também Waldron et al., (1985) *Plant Mol. Biol.* 5:103-108; Zhijian et al., (1995) *Plant Science* 108:219-227); trpB, que permite que células utilizem o indol no lugar de triptofano; hisD, que permite que células utilizem o histinol em lugar de histidina (Hartman, *Proc. Natl.* (1988) *Acad. Sci., USA* 85:8047); manose-6-fosfato isomerase que permite que células utilizem manose (WO 94/20627); ornitina descarboxilase, que confere resistência ao inibidor de ornitina descarboxilase, 2-(difluormetil)-DL-ornitina (DFMO; McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.); e deaminase oriunda de *Aspergillus terreus*, que confere resistência a Blasticidina S (Tamura, (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:2336-2338). Marcadores selecionáveis adicionais incluem, por exemplo, um mutante de EPSPV-sintase, que confere resistência a glifosato (Hinchee et al., (1998) *BioTechnology* 91:915-922), um mutante de acetolactato sintase, que confere

resistência a imidazolinona ou sulfoniluréia (Lee et al., (1988) *EMBO J.* 7:1241-1248), um mutante de psbA, que confere resistência a atrazina (Smeda et al., _(1993) *Plant Physiol.* 103:911-917), ou um mutante de protoporfirinogeno oxidase (ver patente número US 5.767.373), ou outros marcadores que conferem resistência a um herbicida tal como o glufosinato. Exemplos de genes de marcador selecionável apropriado incluem, mas não ficam limitados a, genes codificantes de resistência a cloranfenicol (Herrera Estrella et al., (1983) *EMBO J.* 2:987-992); estreptomicina (Jones et al., (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); espectinomicina (Bretagne-Sagnard et al., (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); bleomicina (Hille et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 7:171-176); sulfonamida (Guerineau et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); bromoxinil (Stalker et al., (1988) *Science* 242:419-423); glifosato (Shaw et al., (1986) *Science* 233:478-481); fosfinotricina (DeBlock et al., (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518), e semelhantes. Uma opção para uso de um gene seletivo é um DNA codificante de glufosinato-resistência e que, em uma concretização, pode ser a fosfinotricina acetil transferase ("PAT"), gene PAT otimizado de milho ou gene *bar* sob o controle dos promotores CaMV 35S ou ubiquitina. Os genes que conferem resistência a bialafos, ver Gordon-Kamm et al., (1990) *Plant Cell* 2:603; Uchimiya et al., (1993) *BioTechnology* 11:835; White et al., (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:1062; Spencer et al., (1990) *Theor. Appl. Genet.* 79:625-631; e Anzai et al., (1989) *Mol. Gen. Gen.* 219:492,). Uma versão

do gene PAT é o gene PAT otimizado de milho, descrito na patente número US 6.096.947.

Adicionalmente, os marcadores que facilitam a identificação de uma célula de planta contendo o polinucleotídeo codificante do marcador incluem, por exemplo, luciferase (Giacomin, (1996) *Plant Sci.* 116:59-72; Scikantha, (1996) *J. Bacteriol.* 178:121), proteína fluorescente verde (Gerdes, (1996) *FEBS Lett.* 389:44-47; Chalfie et al., (1994) *Science* 263:802), e outras variantes da proteína fluorescente, ou ß-glucuronidase (Jefferson, (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387; Jefferson et al., (1987) *EMBO J.* 6:3901-3907; Jefferson, (1989) *Nature* 342(6251): 837-838); a produção de genes de milho que regulam o pigmento (Ludwig et al., (1990) *Science* 247:449; Grotewold et al., (1991) PNAS 88:4587-4591,; Cocciolone et al., (2001) Plant J 27(5):467-478,; Grotewold et al., (1998) Plant Cell 10:721-740); ß -galactosidase (Teeri et al., (1989) *EMBO J.* 8:343-350); luciferase (Ow et al., (1986) *Science* 234:856-859); cloranfenicol acetiltransferase (CAT) (Lindsey e Jones, (1987) *Plant Mol. Biol.* 10:43-52); e numerosos outros como aqui revelado ou de outra forma conhecidos do estado da técnica. Tais marcadores também podem ser usados como moléculas repórter. Muitas variações em promotores, marcadores selecionáveis e outros componentes do constructo estão disponíveis para os técnicos no assunto.

O termo "planta" é aqui usado de forma ampla para incluir qualquer planta em qualquer estágio de desenvolvimento, ou a parte de uma planta, incluindo um corte de planta, uma célula de planta, uma cultura de célula de planta, um órgão de planta, uma semente de planta, e uma plântula. Uma célula de planta é a unidade estrutural e fisiológica da planta, compreendendo um protoplasto e uma parede de célula. Uma célula de planta pode estar na forma de uma única célula isolada ou agregado de células tal como um calo friável, ou uma célula cultivada, ou pode ser parte de uma unidade superior organizada, por exemplo, um tecido de planta, um órgão de planta ou planta. Portanto, uma célula de planta pode ser um protoplasto, uma célula produtora de gameta, ou uma célula ou coleção de células que pode se regenerar na forma de uma planta completa. Como tal, uma semente, a qual compreende múltiplas células de planta e é capaz de se regenerar na forma de uma planta completa, é considerada uma célula de planta para as finalidades desta descrição. Um tecido de planta ou órgão de planta pode ser uma semente, protoplasto, calo, ou quaisquer outros grupos de células de planta, que está organizado em uma unidade estrutural ou funcional. Partes de uma planta particularmente utilizáveis incluem partes que são passíveis de serem colhidas e partes utilizáveis na propagação de plantas da progênie. Uma parte de uma planta passível de ser colhida pode ser qualquer parte de uma planta utilizável, por exemplo, flores, pólen, mudas, tubérculos, folhas, caules, fruta, sementes, raízes e

semelhantes. Uma parte de uma planta utilizável em propagação inclui, por exemplo, sementes, frutas, cortes, mudas, tubérculos, porta-enxertos, e semelhantes.

Uma planta transgênica pode ser regenerada a partir de uma célula de planta geneticamente modificada, ou seja, uma planta completa pode ser regenerada a partir de uma célula de planta; um grupo de células de planta, um protoplasto; uma semente; ou um pedaço de uma planta tal como uma folha, um cotilédone ou um corte. A regeneração a partir de protoplastos varia entre espécies de plantas. Por exemplo, uma suspensão de protoplastos pode ser feita e, em certas espécies, a formação de embrião pode ser induzida a partir da suspensão de protoplastos, até o estágio de amadurecimento e germinação. O meio de cultura, em geral, contém vários componentes necessários ao crescimento e regeneração, incluindo, por exemplo, hormônios, tais como auxinas e citocininas; e aminoácidos tais como ácido glutâmico e prolina, dependendo da espécie particular da planta. A regeneração eficiente dependerá, em parte, do meio, do genótipo e do histórico da cultura e é reproduzível se essas variáveis forem controladas.

A regeneração pode ocorrer a partir de calo de planta, explantes, órgãos ou partes de planta. A transformação pode ser realizada no contexto de regeneração de órgão ou de parte de planta, (ver *Meth. Enzymol.* Vol. 118; Klee et al., (1987) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:467). Utilizando o

método de transformação-regeneração-em-disco de folha, por exemplo, os discos são cultivados em meio de seleção, seguido da formação de brotação em cerca de duas a quatro semanas (ver Horsch et al., acima mencionado, 1985). As brotações que se desenvolvem são excisadas a partir dos calos e transplantadas para um meio de seleção raiz-induzido apropriado. As plântulas enraizadas são transplantadas para o solo o mais rápido possível após o aparecimento das raízes. As plântulas são replantadas como requerido, até alcançarem a maturidade. Esta é a geração T0.

Em culturas semente-propagadas, as plantas T0 maduras podem ser auto-polinizadas. As sementes resultantes podem ser crescidas e as plantas progênitas testadas para a presença do transgene, em geral pelo *screening* para a expressão de um gene marcador ligado. Estas plantas transgênicas representam a geração T1. Gerações múltiplas (T2, T3, etc.) podem ser produzidas para garantir que a expressão da característica fenotípica desejada é mantida estavelmente e herdada, e que as sementes podem ser colhidas. Desta forma, a presente invenção fornece um semente transformada (também referida como "semente transgênica") que possui um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um cassete de expressão da invenção, estavelmente incorporado em seu genoma. Os métodos para a auto-polinização, seleção e melhoramento cruzado de plantas e seleção das plantas resultantes do cruzamento tendo características desejáveis ou outras características de

interesse incluem aqueles aqui revelados e outros bem conhecidos dos melhoristas de planta. Progênie, variantes, e mutantes das plantas regeneradas também estão incluídos no escopo da invenção, dado que estes compreendam os polinucleotídeos introduzidos.

Em vários aspectos da presente invenção, um ou mais transgenes é introduzido nas células. Quando usado com referência a um transgene, o termo "introduzir" significa transferir a molécula de ácido nucléico exógeno para uma célula. Uma célula de ácido nucléico pode ser introduzida em uma célula de planta por uma diversidade de métodos. Por exemplo, o trangene pode estar contido em um vetor, pode ser introduzido em uma célula de planta usando um método de transferência direta de gene, tal como eletroporação ou transformação mediada por microprojétil, ou usando transformação mediada por *Agrobacterium*. Como aqui usado, o termo "transformado" se refere a uma célula de planta contendo uma molécula de ácido nucléico exogenamente introduzida.

Uma ou mais moléculas de ácido nucléico exógeno pode ser introduzida em células de planta usando qualquer um dos numerosos métodos bem conhecidos ou os de rotina para transformação de planta, incluindo protocolos de transformação biológica e física de planta (ver, por exemplo, Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants"; *In* Methods in Plant Molecular Biology and

Biotechnology, Glick e Thompson, Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) páginas 67-88). Adicionalmente, os vetores de expressão e os métodos de cultura *in vitro* para a transformação de célula ou tecido de planta e regeneração de plantas são rotineiros e bem conhecidos (ver, por exemplo, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation"; *Id.* at pages 89-119).

Métodos apropriados para transformar células de planta incluem a microinjeção, Crossway *et al* (1986) *Biotechniques* 4:320-334; eletroporação, Riggs *et al* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 83:5602-5606; transformação *Agrobacterium*-mediada, ver, por exemplo, patente US 5.563.055 de Townsend *et al.*; transferência direta de gene, Paszkowski *et al* (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722; e aceleração balística de partícula, ver, por exemplo, US 4.945.050 de Sanford *et al.*; Tomes *et al* (1995) em *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg e Phillips (Springer-Verlag, Berlin); e McCabe *et al* (1988) *Biotechnology* 6:923-926. Também pode ser consultado Weissinger *et al* (1988) *Annual Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford *et al* (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebola); Christou *et al* (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe *et al* (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Datta *et al* (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85:4305-4309 (milho); Klein *et al* (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (milho); Klein *et al* (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (milho); Fromm *et al* (1990) *Biotechnology* 8:833-

839; Hooydaas-Van Slogteren *et al* (1984) *Nature* (London) 311:763-764; Bytebier *et al* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 84:5345-5349 (*Liliaceae*); De Wet *et al* (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. G. P. Chapman *et al* (Longman, New York), pp. 197-209 (pólen); Kaeppler *et al* (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418; e Kaeppler *et al* (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformação filamento-mediada); D.Halluin *et al* (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (eletroporação); Li *et al* (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 e Christou *et al* (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda *et al* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (milho via *Agrobacterium tumefaciens*); todos aqui incorporados a título de referência.

A transformação *Agrobacterium*-mediada provê um método útil para introduzir um transgene em plantas (Horsch et al., (1985) *Science* 227:1229). *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias de solo patogênicas para planta que transformam geneticamente células de planta. Os plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e de *A. rhizogenes*, respectivamente, portam genes responsáveis por transformação genética da planta (ver, por exemplo, Kado, (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.*10:1; ver, também, Moloney et al., (1989) *Plant Cell Reports* 8:238; patente número US 5.591.616; WO 99/47552; Weissbach e Weissbach, "Methods for Plant Molecular Biology" (Academic Press, NY 1988), seção VIII, páginas 421-463; Grierson e Corey, "Plant Molecular

Biology" 2d Ed. (Blackie, London 1988), Capítulos 7-9; ver, também, Horsch et al., acima citado, 1985).

Com relação à *A. tumefaciens*, a forma do tipo selvagem contém um plasmídeo Ti, o qual dirige a produção de crescimento de tumoração de galha-da-coroa em plantas hospedeiras. A transferência da região de T-DNA tumor-indutor do plasmídeo Ti para um genoma de planta requer os genes de virulência do plasmídio Ti-codificado, assim como as seqüências de extremidade do T-DNA, os quais são um conjunto de repetições de DNA direto que delineiam a região a ser transformada. Um vetor baseado em *Agrobacterium* é uma forma modificada de um plasmídeo Ti, no qual as funções tumor-induzidas são substituídas por uma seqüência de nucleotídeos de interesse para ser introduzida no hospedeiro de planta. Os métodos que usam a transformação *Agrobacterium*-mediada incluem o co-cultivo de *Agrobacterium* com protoplastos isolados cultivados; a transformação de células ou tecidos de planta com *Agrobacterium*; e transformação de sementes, ápices ou meristemas com *Agrobacterium*. Adicionalmente, a transformação *in planta* por meio de *Agrobacterium* pode ser realizada usando infiltração de uma suspensão de células de *Agrobacterium* (Bechtold et al., (1993) *C.R. Acad. Sci. Paris* 316:1194).

A transformação *Agrobacterium*-mediada pode empregar vetores co-integrados ou sistemas de vetor binários, nos quais os componentes do plasmídeo Ti são divididos entre um

vetor *helper*, o qual reside permanentemente no hospedeiro *Agrobacterium* e porta os genes de virulência, e um vetor *shuttle*, o qual contém o gene de interesse limitado pelas seqüências do T-DNA. Os vetores binários são bem conhecidos no estado da técnica (ver, por exemplo, De Framond, (1983) *BioTechnology* 1:262; Hoekema et al., (1983) *Nature* 303:179) e estão disponíveis comercialmente (Clontech; Palo Alto CA). Para a transformação, a *Agrobacterium* pode ser co-cultivada, por exemplo, com células de planta ou tecido de ferimento, tais como tecido de folha, explantes de raiz, hipocotilédones, cotilédones, pedaços de caule ou tubérculos (ver, por exemplo, Glick e Thompson, "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (Boca Raton FL, CRC Press 1993)). As células de ferimento dentro do tecido de planta que tenha sido infectado por *Agrobacterium* pode desenvolver órgãos *de novo* quando cultivados sob condições apropriadas; as brotações transgênicas resultantes eventualmente dão origem a plantas transgênicas que contêm o polinucleotídeo introduzido.

A transformação *Agrobacterium*-mediada tem sido usada para produzir uma diversidade de plantas transgênicas, incluindo, por exemplo, plantas crucíferas transgênicas, tais como *Arabidopsis*, mostarda, semente de colza e linho; plantas leguminosas transgênicas, tais como alfafa, ervilha, soja, trevo trifoliado e branco, e plantas solanáceas transgênicas, tais como berinjela, petúnia, batata, tabaco e tomate (ver, por exemplo, Wang et al., "Transformation of Plants and Soil Microorganisms"

(Cambridge, University Press 1995)). Adicionalmente, a transformação *Agrobacterium*-mediada pode ser usada para introduzir uma molécula de ácido nucléico exógeno em maçã, faia, beladona, groselha preta, cenoura, aipo, algodão, pepino, uva, rábano silvestre, alface, ipoméia, melão almiscareiro, amargosa (*neem*), *poplar*, morango, beterraba de açúcar, couve-flor, nogueira, aspargos, arroz, trigo, sorgo, cevada, milho, e outras plantas (ver, por exemplo, Glick e Thompson, acima mencionado, 1993; Hiei et al., (1994) *Plant J.* 6:271-282,; Shimamoto, (1995) *Science* 270:1772-1773,).

Cepas apropriadas de *A. tumefaciens* e vetores, assim como a transformação de Agrobactéria e meio apropriado de crescimento e seleção são bem conhecidos no estado da técnica (GV3101, pMK90RK), Koncz, (1986) *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396; (C58C1, pGV3850kan), Deblaere, (1985) *Nucl. Acid Res.* 13:4777; Bevan, (1984) *Nucleic Acid Res.* 12:8711; Koncz, (1986) P*roc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8467-8471; Koncz, (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:963-976; Koncz, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: Plant Molecular Biology Manual Vol. 2, Gelvin e Schilperoort (Eds.), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publ. (1994), 1-22; Patente Européia A-1 20 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Capítulo V; Fraley, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 4:1-46; An, (1985) *EMBO J.* 4:277-287).

Como aqui notado, a presente invenção provê vetores capazes de expressar genes de interesse sob o controle de elementos de regulação. Em geral, os vetores devem ser funcionais em células de planta. Às vezes, pode ser preferível ter vetores que sejam funcionais em *E. coli* (por exemplo, produção de proteína para o surgimento de anticorpos, análise de seqüência de DNA, construção de insertos, obtenção de ácidos nucléicos em quantidade). Os vetores e procedimentos para clonagem e expressão em *E. coli* são descritos em Sambrook et al (acima mencionado).

O vetor de transformação, compreendendo o promotor da presente invenção operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeos isolada em um cassete de expressão, também pode conter pelo menos uma seqüência de nucleotídeos adicional para um gene a ser co-transformado dentro do organismo. Alternativamente, a(s) seqüência(s) adicional(is) pode(m) ser provida(s) em um outro vetor de transformação.

Quando a molécula de ácido nucléico exógeno está contida em um vetor, o vetor pode conter elementos funcionais, por exemplo, seqüências de "extremidade esquerda" e de "extremidade direita" do T-DNA de *Agrobacterium*, o qual permite a integração estável dentro de um genoma de planta. Além disso, os métodos e vetores que permitem a geração de plantas transgênicas livres de marcador, por exemplo, quando um gene de marcador

selecionável é perdido em um certo estágio do desenvolvimento da planta ou do melhoramento da planta, são conhecidos e incluem, por exemplo, métodos de co-transformação (Lyznik, (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:151-161; Peng, (1995) *Plant Mol. Biol.* 27:91-104), ou métodos que utilizam enzimas capazes de promover a recombinação homóloga em plantas (ver, por exemplo, W097/08331; Bayley, (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:353-361; Lloyd, (1994) *Mol. Gen. Genet.* 242:653-657; Maeser, (1991) *Mol. Gen. Genet.* 230:170-176; Onouchi, (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:6373-6378; ver, também, Sambrook et al., acima mencionado, 1989).

Os métodos de transferência direta de gene podem ser usados para introduzir o transgene (ou transgenes) desejado em células, incluindo células de planta que sejam refratárias à transformação *Agrobacterium*-mediada (ver, por exemplo, Hiei et al., (1994) *Plant J.* 6:271-282; patente número US 5.591.616). Tais métodos incluem a transferência direta de gene (ver Patente Européia 164575), injeção, eletroporação, métodos de biobalística tais como bombardeamento com partícula, transformação pólen-mediada, transformação RNA de vírus-mediada de planta, transformação lipossomo-mediada, transformação usando embriões imaturos com ferimento ou enzima-degradados, e semelhantes. Os métodos de transformação de gene direta incluem os métodos de transformação microprojétil-mediada (biobalística), em que o transgene é levado na superfície de microprojéteis medindo de 1 a 4 mm. Um vetor, particularmente um vetor de expressão contendo o(s) transgene(s) de interesse, é

introduzido em tecidos de planta com um dispositivo de biobalística que acelera os microprojéteis a velocidades de 300 a 600 m/s, suficiente para penetrar nas paredes e membranas da célula da planta (ver, por exemplo, Sanford et al., (1987) *Part. Sci. Technol.* 5:27; Sanford, (1988) *Trends Biotech.* 6:299; Klein et al., (1988) *BioTechnology* 6:559-563; Klein et al., (1992) *BioTechnology* 10:268). Em milho, por exemplo, diversos tecidos alvo podem ser bombardeados com microprojéteis recobertos com DNA de modo a produzir plantas transgênicas, incluindo, por exemplo, calo (Tipo I ou Tipo II), embriões imaturos e tecido de meristema.

Outros métodos para distribuição física de um transgene em plantas utilizam a sonicação de células alvo (Zhang et al., (1991) *BioTechnology* 9:996); lipossomos ou fusão de esferoplastos (Deshayes et al., (1985) *EMBO J.* 4:2731; Christou et al., (1987) *Proc Natl. Acad. Sci., USA* 84:3962); precipitação ou incubação de $CaCl_2$ com álcool polivinílico ou poli-L-ornitina (Hain et al., (1985) *Mol. Gen. Genet.*199: 61; Draper et al., (1982) *Plant Cell Physiol.*23:451); e eletroporação de protoplastos e células e tecidos completos (Donn et al., (1990) In "Abstracts of VIIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture" IAPTC, A2-38, pg. 53; D'Halluin et al., (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505; Spencer et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:51-61).

Um método de transferência de gene direta, tal como a eletroporação pode ser particularmente útil para introduzir moléculas de ácido nucléico exógeno em uma célula, tal como uma célula de planta. Por exemplo, os protoplastos de planta podem ser eletroporados na presença de uma molécula de ácido nucléico recombinante, a qual pode ser um vetor (Fromm et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:5824). Os impulsos elétricos de alta força de campo permeabilizam reversivelmente membranas permitindo a introdução de ácido nucléico. Os protoplastos de planta eletroporados reformam a parede da célula, dividem e formam um calo de planta. A microinjeção pode ser realizada como descrito em Potrykus e Spangenberg (eds.), Gene Transfer To Plants. Springer Verlag, Berlin, NY (1995). A célula de planta transformada contendo a molécula de ácido nucléico recombinante introduzida pode ser identificada devido à presença de um marcador selecionável incluído no constructo.

Como mencionado acima, a transformação mediada por microprojétil também provê um método útil para introduzir moléculas de ácido nucléico exógeno em uma célula de planta (Klein et al., (1987) *Nature* 327:70-73). Este método utiliza microprojéteis, tais como os de ouro ou tungstênio, os quais são revestidos com a molécula de ácido nucléico desejado por precipitação com cloreto de cálcio, espermidina ou polietileno glicol. As partículas de microprojétil são aceleradas a alta velocidade para dentro de um tecido de planta usando um dispositivo tal como o disparador de partícula BIOLISTIC PD-1000 (BioRad; Hercules

CA). O método de entrega mediado por microprojétil ("bombardeamento de partícula") é especialmente útil para transformar células de planta que são difíceis de transformar ou regenerar usando outros métodos. Os métodos de transformação usando métodos de biobalística são bem conhecidos (Wan, (1984) *Plant Physiol.* 104:37-48; Vasil, (1993) *BioTechnology* 11:1553-1558; Christou, (1996) *Trends in Plant Science* 1:423-431). A transformação mediada por microprojétil foi usada, por exemplo, para gerar uma diversidade de espécies de plantas transgênicas, incluindo algodão, tabaco, milho, trigo, aveia, cevada, sorgo, arroz, *poplar* híbrido e papaia (ver Glick e Thompson, acima mencionado, 1993; Duan et al., (1996) *Nature Biotech.* 14:494-498; Shimamoto, (1994) Curr. Opin. Biotech. 5:158-162).

Um sistema de rápida transformação e regeneração para a produção de plantas transgênicas, tal como um sistema que produz trigo transgênico em dois ou três meses (ver Patente Européia número EP 0709462A2) também pode ser utilizável para produzir uma planta transgênica de acordo com um método da invenção, permitindo, assim, uma identificação mais rápida de funções de gene. A transformação da maioria das plantas dicotiledôneas é possível com os métodos descritos acima. A transformação de plantas monocotiledôneas também pode ser realizada usando, por exemplo, os métodos de biobalística descritos acima, a transformação de protoplastos, a eletroporação de células parcialmente permeabilizadas, a introdução de DNA usando

fibras de vidro, a transformação *Agrobacterium*-mediada, e semelhantes.

A transformação de plastídeo também pode ser usada para introduzir uma molécula de ácido nucléico em uma célula de planta (patentes números US 5.451.513, US 5.545.817 e US 5.545.818; WO 95/16783; McBride et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:7301-7305). A transformação de cloroplasto envolve a introdução de regiões de DNA de plastídeo clonado flanqueando uma seqüência de nucleotídeos desejada, por exemplo, um marcador selecionável junto com o polinucleotídeo de interesse, para um tecido alvo apropriado, usando, por exemplo, um método de transformação de biobalística ou de protoplasto (por exemplo, transformação mediada por cloreto de cálcio ou PEG). As regiões flanqueadoras de 1 a 1,5 kb ("seqüências alvo") facilitam a recombinação homóloga com o genoma do plastídeo, e permite a substituição ou modificação de regiões específicas do plastoma. Usando este método, as mutações pontuais nos genes de cloroplasto 16S rRNA e rps12, os quais conferem resistência a espectinomicina e estreptomicina e podem ser utilizados como marcadores selecionáveis de transformação (Svab et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 87:8526-8530; Staub e Maliga, (1992) *Plant Cell* 4:39-45), resultaram em transformantes homoplásmicos estáveis, a uma freqüência de aproximadamente um por 100 bombardeios de folhas alvo. A presença de sítios de clonagem entre esses marcadores permitiu a criação de um vetor de plastídeo alvo para a

introdução de genes estrangeiros (Staub e Maliga, (1993) *EMBO J.* 12:601-606). Aumentos substanciais na freqüência de transformação são obtidos pela substituição de genes recessivos de rRNA ou de genes de resistência a antibiótico r-proteína com um marcador selecionável dominante, o gene bacteriano aadA codificante de enzima espectinomicina-destoxificante aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase (Svab e Maliga, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:913-917). Aproximadamente 15 a 20 ciclos de divisão celular, seguidos de transformação, são, em geral, requeridos para se alcançar o estado homoplastídico. A expressão de plastídeo, na qual os genes são inseridos por recombinação homóloga em todas dos diversos milhares de cópias do genoma de plastídeo circular presente em cada célula de planta, tem a vantagem de que o ganho em um número enorme de cópias com relação aos genes nuclear-expressados permite a expressão de níveis que podem facilmente exceder 10% da proteína de planta solúvel total.

As células que foram transformadas podem ser deixadas a crescer até plantas de acordo com a maneira tradicional, ver, por exemplo, McCormick *et al* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Essas plantas podem ser deixadas a crescer e polinizadas com a mesma linhagem transformada ou linhagens diferentes e as plantas resultantes tendo a expressão da característica fenotípica desejada podem ser identificadas. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para assegurar que a expressão da característica fenotípica desejada é estavelmente mantida e herdada.

Uma "planta objeto" ou "célula de planta objeto" é uma em qual uma alteração genética, por exemplo transformação, foi efetuada para um gene de interesse, ou é uma planta ou célula de planta descendente de uma planta ou célula de planta alterada desta forma e que compreende a alteração. Uma "planta controle" ou "célula de planta controle" fornece um ponto de referência para medir alterações na planta objeto ou célula objeto.

Uma planta controle ou célula de planta controle pode compreender, por exemplo: (a) uma planta ou célula de planta selvagem, ou seja, do mesmo genótipo do material de partida para a alteração genética que resultou na planta objeto ou célula de planta objeto; (b) uma planta ou célula de planta do mesmo genótipo do material de partida mas que foi transformada com um construto nulo (ou seja, com um construto que não possui efeito conhecido na característica de interesse, como por exemplo um construto compreendendo um gene marcador); (c) uma planta ou célula de planta que é uma segregada não-transformada entre a progênie de uma planta objeto ou célula de planta objeto; (d) uma planta ou célula de planta geneticamente idêntica a uma planta objeto ou célula de planta objeto mas que não está exposta Às condições ou estímulos que iriam induzir a expressão do gene de interesse; ou (e) a própria planta objeto ou célula de planta objeto, sob condições nas quais o gene de interesse não é expresso.

Em certas espécies, como o milho, as plantas controle e referência podem representar dois híbridos, onde o primeiro híbrido é produzido de duas linhagens parentais auto-polinizadas, e o segundo híbrido é produzido das mesmas duas linhagens parentais auto-polinizadas exceto que uma das linhagens parentais auto-polinizadas contém um construto de DNA recombinante. O desempenho do segundo híbrido seria tipicamente medido relativamente ao primeiro híbrido.

Adicionalmente, quando uma planta compreendendo um construto de DNA recombinante é avaliada ou medida relativamente a uma planta controle que não compreende o DNA recombinante mas que de outra forma possui uma base genética comparável à da planta, a planta controle e a referência podem compartilhar pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência de material genético nuclear. Existem muitas técnicas baseadas em laboratório disponíveis para a análise, comparação e caracterização da base genética de uma planta; entre estes estão eletroforese com isoenzimas, análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), reação de polimerase em cadeia randomicamente amplificada (AP-PCR), impressão Genômica do DNA Amplificado (DAF), região amplificada de seqüência caracterizada (SCAR), polimorfismo de comprimento de fragmento

amplificado (AFLP), e repetições de sequências simples (SSR) os quais são também chamados de microssátélites.

As plantas apropriadas para as finalidades da presente invenção podem ser as monocotiledôneas e as dicotiledôneas e incluem, mas não ficam limitadas a, milho, trigo, cevada, centeio, batata doce, feijão, ervilha, endívia, alface, repolho, couve-flor, brócolis, nabo, rabanete, espinafre, aspargos, cebola, alho, pimenta, aipo, abóbora tipo *squash*, abóbora tipo *pumpkin*, cânhamo, abobrinha, maçã, pêra, marmelo, melão, ameixa, cereja, pêssego, nectarina, abricó, morango, uva, framboesa, amora silvestre, abacaxi, abacate, papaia, manga, banana, soja, tomate, sorgo, cana-de-açúcar, beterraba de açúcar, couve-flor, colza, trevo, tabaco, cenoura, algodão, alfafa, arroz, batata, berinjela, pepino, *Arabidopsis thaliana*, e plantas lenhosas tais como as árvores coníferas e deciduais. Portanto, uma planta transgênica ou célula de planta geneticmente modificada da invenção pode ser um angiosperma ou gimnosperma.

As angiospermas são divididas em duas grandes classes com base no número de cotilédones, os quais são folhas de semente que geralmente armazenam ou absorvem alimento; uma angiosperma monocotiledônea possui um único cotilédone, e uma angiosperma dicotiledônea possui dois cotilédones. As angiospermas produzem uma variedade de produtos úteis, incluindo materiais como madeira, borracha e papel; fibras como algodão e linho; ervas e produtos medicinais tais como

quinino e vinblastina; flores ornamentais tais como rosas e, quando incluídas dentro do escopo da presente invenção, orquídeas; e alimentos, tais como grãos, óleos, frutas e vegetais. As angiospermas englobam uma variedade de plantas que florescem, incluindo, por exemplo, plantas de cereal, plantas leguminosas, plantas de óleo de semente, árvores de madeira dura, plantas portadoras de fruto e flores ornamentais, cujas classes gerais não são necessariamente exclusivas. As plantas de cereal, que produzem grãos comestíveis incluem, por exemplo, milho, arroz, trigo, cevada, aveia, centeio, *orchardgrass* (forrageira *Dactylis glomerata*), capim-colonião e sorgo. As plantas leguminosas incluem membros da família da ervilha (*Fabaceae*) e produzem um fruto característico conhecido como legume. Exemplos de plantas leguminosas incluem, por exemplo, soja, ervilha, grão-de-bico, vigna, fava, feijão-roxo, feijão-fava, lentilha, feijão caupi, feijoeiro e amendoim; bem como alfafa, cornichão, trevo e sanfeno. As plantas de óleo de semente, que possuem sementes e que são úteis como uma fonte de óleo, incluem soja, girassol, colza (canola) e semente de algodão. As angiospermas também incluem árvores de madeira dura, as quais são plantas lenhosas perenes que geralmente possuem um único caule (tronco). Exemplos de tais árvores incluem amieiro, freixo, tília americana (*linden*), faia, vidoeiro, cerejeira, choupo, olmo, eucalipto, nogueira, alfarrobeira, *maple*, carvalho, caquizeiro, choupo, sicômoro, nogueira, sequóia, salgueiro. As árvores são úteis, por exemplo, como fonte de polpa, papel, material de estrutura e combustível.

As angiospermas produzem sementes encerradas dentro de um ovário sazonado e amadurecido. Um fruto de angiosperma pode ser apropriado para consumo humano ou animal ou para a coleção de sementes para propagar as espécies. Por exemplo, o lúpulo é um membro da família das moráceas que são apreciadas pelo seu aroma no licor de malte. As angiospermas portadores de fruto também incluem as árvores de uva, laranja, limão, *grapefuit*, abacate, tâmara, pêssego, cereja, oliva, ameixa, coco, maçã e pêra e as plantas de amora silvestre, *blueberry*, framboesa, morango, abacaxi, tomate, pepino e berinjela. Uma flor ornamental é uma angiosperma cultivada pela sua flor decorativa. Exemplos de flores ornamentais comerciais importantes incluem as plantas de rosa, lírio, tulipa e crisântemo, boca-de-leão, camélia, cravo e petúnia, e podem incluir orquídea. Deve ser reconhecido que a presente invenção também pode ser praticada usando gimnospermas, as quais não produzem semente em um fruto.

Certas concretizações desta invenção suplantam o problema de manutenção de caracteres reprodutores recessivos homozigotos quando se usa uma abordagem de restauração transgênica, enquanto se reduz o número de plantas, plantações e etapas necessárias à manutenção de plantas com tais caracteres.

A homozigosidade é uma condição genética existente quando alelos idênticos residem em lócus correspondentes nos cromossomos homólogos. A heterozigosidade é uma condição genética existente quando alelos diferentes residem em lócus correspondentes em cromossomos homólogos. A hemizigosidade é uma condição genética existente quando há somente uma cópia de um gene (ou conjunto de genes) sem a contraparte alélica no cromossomo irmão.

A manutenção da condição recessiva homozigota com relação à esterilidade masculina é alcançada pela introdução em uma planta de um constructo de restauração de transgene que está ligado a uma seqüência que interfere com a formação, função ou dispersão de gametas masculinos da planta para criar uma planta "mantenedora" ou "doadora". O transgene de restauração, sob introdução em uma planta que é recessiva homozigota em relação ao caractere genético de esterilidade masculina, restaura a função genética daquele caractere. Devido ao fato de o gene ligado ser dirigido por um promotor gameta-masculino-específico, todo o pólen contendo o transgene de restauração é tornado não-viável. Todo o pólen viável produzido contém uma cópia do alelo recessivo, mas não contém o transgene de restauração. O transgene é mantido no estado hemizigoto na planta mantenedora.

O pólen da mantenedora pode ser usado para fertilizar plantas que são homozigotas com relação ao caractere

recessivo, e a progênie, portanto, reterá sua condição recessiva homozigota. A planta mantenedora contendo o constructo do transgene de restauração é propagada por auto-fertilização, com metade da semente resultante usada para produzir plantas adicionais que são recessivas homozigotas com relação ao gene de interesse e hemizigotas com relação ao constructo de transgene de restauração.

A planta mantenedora serve como uma doadora de pólen para a planta tendo o caractere recessivo homozigoto. A mantenedora é produzida de forma ótima a partir de uma planta tendo um caractere recessivo homozigoto e a qual também possui seqüências de nucleotídeos introduzidas nela, as quais devem restaurar o caractere criado pelos alelos recessivos homozigotos. Além disso, a seqüência de restauração é ligada às seqüências de nucleotídeos que interferem com a função, formação ou dispersão de gametas masculinos. O gene pode operar para evitar a formação de gametas masculinos ou evitar a função dos gametas masculinos por qualquer uma de uma diversidade de modalidades bem conhecidas e não está limitada a uma metodologia particular. A título de exemplo, mas não de limitação, isto pode incluir o uso de um ou mais genes que expressam um produto citotóxico para gametas masculinos, (ver, por exemplo, patentes números US 5.792.853 e US 5.689.049; PCT/EP89/00495); inibem a formação de produto de um outro gene importante para a formação, função ou dispersão do gameta masculino (ver, patentes números US 5.859.341 e US 6.297.426); se combinam com um outro produto

de gene para produzir uma substância que evite a formação, função ou dispersão do gameta (ver patentes números US 6.162.964; US 6.013.859; US 6.281.348; US 6.399.856; US 6.248.935; US 6.750.868 e US 5.792.853); são antisense em relação a ou causam a co-supressão de um gene crítico para a formação, função ou dispersão do gameta masculino (ver patentes números US 6.184.439; US 5.728.926; US 6.191.343; US 5.728.558 e US 5.741.684), ou semelhantes.

Ordinariamente, para produzir mais plantas tendo uma condição recessiva, pode-se cruzar a planta recessiva com uma outra planta recessiva, ou auto-polinizar uma planta recessiva. Isto pode ser não desejável para alguns caracteres recessivos e pode ser impossível para caracteres recessivos que afetam o desenvolvimento reprodutivo. Alternativamente, pode-se cruzar a planta homozigota com uma segunda planta tendo o gene de restauração, mas isto requer cruzamento adicional para segregar o gene de restauração para mais uma vez alcançar o estado fenotípico recessivo. Ao invés disso, em uma concretização da invenção é provido um processo no qual a condição recessiva homozigota pode ser mantida, apesar do cruzamento dela com a planta mantenedora. Este método pode ser usado com qualquer situação na qual é desejado continuar a condição recessiva. Isto resulta em um sistema relativamente simples e eficaz do ponto de vista de custos para manter uma população de plantas recessivas homozigotas.

Quando a condição recessiva homozigota é aquela que produz esterilidade masculina, a planta mantenedora, por necessidade, precisa conter um constructo de transgene de restauração funcional capaz de complementar a mutação e tornar a planta recessiva homozigota capaz de produzir pólen viável. A ligação deste gene de restauração de fertilidade masculina com uma segunda seqüência de nucleotídeos funcional a qual interfere com a formação, função ou dispersão dos gametas masculinos da planta resulta em uma planta mantenedora que produz pólen contendo somente o alelo recessivo do gene restaurado no seu lócus nativo devido à ação citotóxica pólen-específica da segunda seqüência de nucleotídeos. Esta fração de pólen viável é não-transgênica com relação ao constructo de transgene de restauração.

Por exemplo, é desejável produzir plantas fêmeas estéreis masculinas para uso no processo de produção de híbridos os quais são estéreis como um resultado de serem homozigotos com relação a uma mutação no gene MS45, um gene que é essencial para a fertilidade masculina. Um tal alelo de MS45 mutante é designado como ms45. Uma planta que é homozigota com relação ao ms45 (representada pela notação ms45/ms45) apresenta o fenótipo de esterilidade masculina recessiva homozigota e produz pólen não funcional, ver patentes números US 5.478.369; US 5.850.014; US 6.265.640 e US 5.824.524. Em ambos os processos de produção de endogâmicas e híbridos, é altamente desejável manter esta condição recessiva homozigota. Quando as seqüências

codificantes do gene MS45 são introduzidas em uma planta tendo a condição homozigota, resulta a restauração esporofítica de fertilidade masculina (Cigan et al (2001) Sex. Plant Repro. 14:135-142). Pelo método da invenção, uma planta que é recessiva homozigota ms45/ms45 pode ter introduzido nela um gene funcional MS45, e, portanto, a fertilidade masculina é restaurada. Este gene pode ser ligado a um segundo gene que opera para tornar o pólen não-funcional ou que evita sua formação, ou que produz um produto letal para o pólen e que está ligado a um promotor que dirige sua expressão nos gametas masculinos. Isto resulta em uma planta que produz pólen viável contendo ms45 sem o constructo de transgene de restauração.

Um exemplo é um constructo que inclui o gene MS45 operacionalmente ligado ao promotor 5126, um promotor tecido masculino-preferido (ver patente número US 5.837.851) e ainda ligado ao gene citotóxico DAM metilase sob o controle do promotor PG47 (ver patentes números US 5.792.853 e US 5.689.049). A planta resultante produz pólen, mas somente o pólen viável que contém o gene ms45. Portanto, ele pode ser usado como um polinizador para fertilizar a planta recessiva homozigota (ms45/ms45), e 100% da progênie produzida continuará a ser estéril masculina como um resultado da manutenção da homozigosidade com relação ao ms45. A progênie não conterá o constructo de transgene de restauração introduzido.

Evidentemente, muitas variações deste método estão disponíveis na medida que ele se relaciona com a esterilidade masculina. Qualquer outro gene crítico para a fertilidade masculina pode ser usado neste sistema. A título de exemplo, e sem limitação, tais genes podem incluir o gene SBMu200 (também conhecido como SB200 ou MS26) descrito no documento WO 02/26789; o gene BS92-7 (também conhecido como BS7) descrito no documento WO 02/063021; gene MS2 descrito em Albertsen e Phillips, "Developmental Cytology of 13 Genetic Male Sterile Loci in Maize" *Canadian Journal of Genetics & Cytology* 23:195-208 (Jan. 1981); ou o gene *Arabadopsis* MS2 descrito em Aarts et al., "Transposon Tagging of a Male Sterility Gene in *Arabidopsis*", *Nature*, 363:715-717 (24 Jun., 1993); e o gene MS1 de *Arabidopsis* descrito em Wilson et al., "The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors", *Plant J.*, 1:27-39 (28 Out., 2001).

Um resultado desejável do processo da invenção é que a planta tendo a seqüência de nucleotídeos restauradora pode ser auto-fertilizada; isto é, o pólen da planta transferida para a flor da mesma planta para se alcançar a propagação de plantas restauradoras. Deve ser observado que a "auto-fertilização" inclui ambas situações, em que a planta que produz o pólen é fertilizada com aquele mesmo pólen, e a situação em que o pólen de uma planta, ou de um grupo de plantas geneticamente idênticas, poliniza uma planta que é

um indivíduo geneticamente idêntico, ou um grupo de tais plantas geneticamente idênticas. O constructo de transgene de restauração não estará presente no pólen, mas ele estará contido em 50% dos óvulos (os gametas femininos). A semente resultante da auto-fertilização pode ser plantada, e a seleção ser feita com relação à semente tendo o constructo de transgene de restauração. O processo de seleção pode ocorrer por qualquer um ou mais dos muitos processos conhecidos, o mais comum sendo aquele em que a seqüência de nucleotídeos de restauração está ligada a um gene marcador. O marcador pode ser quantificável ou selecionável, e permite a identificação da semente compreendendo a seqüência de restauração e/ou daquelas plantas produzidas a partir da semente tendo a seqüência de restauração.

Em uma concretização da invenção, é possível prover o promotor que dirige o gene de restauração como um promotor induzível. Controle adicional é, portanto, permitido no processo, quando for desejado, pelo provimento de que a planta tendo as seqüências de nucleotídeos de restauração seja constitutivamente estéril masculina. Este tipo de esterilidade masculina é apresentado na patente número US 5.859.341. De modo a tornar a planta fértil, a substância de indução precisa ser provida, e a planta se tornará fértil. Mais uma vez, quando combinado com o processo da invenção como acima descrito, o único pólen produzido não conterá as seqüências de nucleotídeos de restauração.

Ainda em uma outra concretização da invenção, o gameta que controla a transmissão das seqüências de nucleotídeos de restauração pode ser o gameta feminino, ao invés do gameta masculino. O processo é o mesmo que o descrito acima, com exceção daqueles casos em que se deseja manter a planta tendo as seqüências de nucleotídeos de restauração por auto-fertilização. Nesse caso, será útil prover o promotor que dirige o gene de restauração como promotor induzível, de modo que a fertilidade feminina pode ser iniciada pela exposição a uma substância indutora, e a semente pode ser formada. O controle da fertilidade feminina, feito dessa maneira, está descrito na patente número US 6.297.426. Exemplos de genes que conferem fertilidade feminina incluem o gene *teosinte branched1* (*Tb1*), o qual aumenta a dominância apical, resultando em múltiplos pendões e repressão de tecido feminino; Hubbard et al (2002) Genetics 162:1927-1935; Doebley et al., (1997) *Nature* 386:485-488. Um outro exemplo é o assim-chamado "barren 3" ou "ba3". Este mutante foi isolado de uma planta de milho mutante infectada com o vírus de mosaico do trigo-listrado e está descrito em Pan e Peterson, (1992) *J. Genet. And Breed.* 46: 291-294. As plantas desenvolvem pendões normais, mas não possuem nenhuma brotação de espiga ao longo dos colmos. A planta colmo-estéril cônico é descrita em Coe e Beckett, (1987) *Maize Genet. Coop. Newslett.* 61:46-47. Outros exemplos incluem o gene *barren stalk1* (Gallavotti et al., (2004) Nature 432:630-635); o mutante de óvulo letal (Vollbrecht, (1994) *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68:2-3); e mutante do pistilo

defeituoso (Miku e Mustyatsa, (1978) *Genetika* 14(2): 365-368).

Quaisquer elementos de promotor planta-compatíveis podem ser empregados para controlar a expressão das regiões do constructo de transgene de restauração que codificam proteínas e funções específicas. Esses podem ser os promotores de gene de planta, tais como, por exemplo, o promotor de ubiquitina, o promotor para a pequena subunidade de ribulose-1, 5-bis-fosfato carboxilase, ou promotores oriundos dos plasmídeos tumor-induzíveis de *Agrobacterium tumefaciens*, tais como os promotores de nopalina sintase e octopina sintase, ou promotores virais, tais como os promotores 19S e 35S do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV) ou o promotor 35S do vírus do mosaico de escrofulária; ver Kay et al., (1987) *Science* 236:1299 e Pedido de Patente Europeu número 0 342 926. Ver o Pedido de Patente Internacional WO 91/19806 para uma recapitulação dos promotores de planta ilustrativos apropriadamente empregados na presente invenção. A gama de promotores planta-compatíveis disponíveis inclui os promotores tecido-específicos e os induzíveis.

A invenção contempla o uso de promotores que fornecem a expressão tecido-preferida, incluindo promotores que preferencialmente expressam o tecido de gameta, masculino e feminino, da planta. A invenção não requer que qualquer promotor particular tecido de gameta-preferido seja usado

no processo, e qualquer um dos muitos ditos promotores conhecidos dos técnicos no assunto pode ser empregado. A título de exemplo, mas não de limitação, um tal promotor é o promotor 5126, o qual preferencialmente dirige a expressão do gene ao qual está ligado ao tecido masculino das plantas, como descrito nas patentes números US 5.837.851 e US 5.689.051. Outros exemplos incluem o promotor MS45 descrito na patente número US 6.037.523; promotor SF3 descrito na patente número US 6.452.069; os promotores BS92-7 ou BS7 descritos no documento WO 02/063021; o promotor SBMu200 descrito no documento WO 02/26789; um elemento de regulação SGB6 descrito na patente número US 5.470.359, e TA39 (Koltunow et al (1990) "Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development." *Plant Cell* 2:1201-1224; Goldberg et al., (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5:1217-1229; e patente US 6.399.856). Ver também Nadeau et al., (1996) Plant Cell 8(2):213-39; e Lu et al., (1996) *Plant Cell* 8(12):2155-68.

Os métodos e construtos da presente invenção podem ser utilizados para transformação de qualquer espécie de planta, incluindo, mas não limitado a, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Exemplos de espécies de planta incluem, mas não se limitam a, milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por exemplo *B. napus, B. rapa, B. juncea*), particularmente aquelas espécies de brássica úteis como fontes de óleo vegetal, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*),

centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghym bicolor, Sorghum vulgare*), milhete (por exemplo mexoeira (*Pennisetum glaucum*), painço português (*Panicum miliaceum*), painço da Itália (*Setaria italica*), capim pé-de-galinha (*Eleusine coracana*)), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine Max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense, Gossypium hirsutum*); batata doce (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (Ananás comosus), árvores cítricas (Citrus spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), bananeira (*Musa* spp.), abacateiro (*Persea americana*), figueira (*Ficus casica*), goiabeira (*Psidium guajava*), mangueira (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), mamoeiro (*Carica papaya*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifólia*), amendoeira (*Prunus amygdalus*), beterraba (*Beta vulgaris*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), aveias, cevada, vegetais, ornamentais, gramíneas e coníferas.

Vegetais incluem tomates (*Lycopersicon esculentum*), alface (por exemplo *Lactuca sativa*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão-manteiga (*Phaseolus limensis*), ervilha (*Lathyrus* spp.), e membros do gênero Cucumis, como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*C. cantalupensis*), e meloeiro (*C. melo*). Ornamentais incluem azaléia (*Rhododendron* spp.), hortência (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipas (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petúnias (*Petunia hybrida*),

cravo (*Dianthus caryophyllus*), poinsétia (*Euphorbia pulcherrima*), e crisântemo.

Em concretizações específicas, plantas da presente invenção são plantas de cultivo (por exemplo, milho, alfafa, girassol, *Brassica*, soja, algodão, cártamo, amendoim, sorgo, trigo, milhete, tabaco, etc.). Em algumas concretizações, as plantas de milho e soja são ótimas, e em certas concretizações as plantas de milho são ótimas.

Outras plantas de interesse incluem plantas de grão que produzem sementes de interesse, plantas oleaginosas, e plantas leguminosas. Sementes de interesse incluem grãos, como milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, centeio, etc. Plantas oleaginosas incluem algodão, soja, cártamo, girassol, *Brassica*, milho, alfafa, palma, coco, etc. Plantas leguminosas incluem feijões e ervilhas. Feijões incluem guar, alfarroba, fenacho, soja, feijão de jardim, feijão-manteiga, fava, lentilhas, grão de bico, etc.

O promotor P67 apresentado na SEQ ID NO: 1 tem um comprimento de 1112 nucleotídeos. Este promotor foi isolado de um clone genômico correspondente a uma seqüência EST de milho. A seqüência mostrou limitada homologia com a pectina metilesterase putativa.

A especificidade de pólen da expressão do P67 foi confirmada por RT-PCR e análise Northern blot de amostras de RNA a partir de diferentes tecidos incluindo folha, raiz, antera/grãos de pólen maduros, pendões em estágio de vacúolo, espigueta, sabugo, palha de milho, estilo-estigma e embrião. Os resultados indicam um elevado nível de especificidade para a expressão em pólen em desenvolvimento, particularmente no estágio de meia-uninucleação.

A análise de Southern blot mostrou que o clone representa os genes de simples-cópia ou baixo número de cópias no genoma de milho. O mapeamento de cromossomo usando a linhagem de substituição do cromossomo de aveia revelou que a seqüência está localizada no Cromossomo 1 de milho.

O clone foi usado para fazer o *screening* de uma biblioteca BAC de milho. Foram encontrados os clones BAC positivos e subclonados em pBluescript KS. Os subclones correspondentes às seqüências de cDNA foram identificadas e seqüenciadas. O sítio de início da transcrição foi determinado usando uma abordagem de amplificação rápida da extremidade 5´ do RNA ligase-mediada. A região do promotor foi denominada P67.

O promotor P95 apresentado na SEQ ID NO: 2 tem um comprimento de 1092 nucleotídeos. Este promotor foi isolado

a partir de um clone genômico correspondente a uma seqüência EST de milho. A seqüência mostrou limitada homologia com a L-ascorbato oxidase putativa.

A especificidade de pólen da expressão de P95 foi confirmada por RT-PCR e análise de Northern blot de amostras de RNA de diferentes tecidos incluindo folha, raiz, grãos de pólen antera/maduros, pendões em estágio de vacúolo, espigueta, sabugo, palha de milho, estilo-estigma e embrião. Os resultados indicam um elevado nível de especificidade com relação à expressão em pólen em desenvolvimento, particularmente no estágio de meia-uninucleação.

A análise de Southern blot mostrou que o clone representa genes de simples-cópia ou de baixo número de cópias no genoma de milho. O mapeamento do cromossomo usando a linhagem de substituição de cromossomo de aveia revelou que a seqüência está localizada nos Cromossomos 6 e 8 de milho.

O clone foi usado para realizar o *screening* de uma biblioteca BAC de milho. Foram encontrados os clones BAC positivos e subclonados em pBluescript KS. Os subclones correspondentes às seqüências de cDNA foram identificados e seqüenciados. O sítio de início de transcrição foi determinado usando uma abordagem de amplificação rápida da

extremidade 5´ do RNA ligase-mediada. A região do promotor foi denominada P95.

Usando técnicas bem conhecidas, seqüências de promotor adicionais podem ser isoladas com base na sua homologia de seqüência com a SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO: 2. Nessas técnicas, o todo ou parte da seqüência de promotor conhecida é usada como uma sonda que hibridiza seletivamente com outras seqüências presentes em uma população de fragmentos de DNA genômico clonados (ou seja, bibliotecas genômicas) a partir de um organismo escolhido. Métodos que estão facilmente disponíveis no estado da técnica para a hibridização de seqüências de ácido nucléico podem ser usados para se obter as seqüências que correspondem a essas seqüências de promotor em espécies incluindo, mas não limitadas a, milho (*corn; Zea mays*), canola (*Brassica napus, Brassica rapa ssp.*), alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor, Sorghum vulgare*), girassol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus spp.*), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa spp.*), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), aveia,

cevada, vegetais, plantas ornamentais, e coníferas. Preferencialmente, as plantas incluem milho, soja, girassol, açafrão, canola, trigo, cevada, centeio, alfafa, e sorgo.

A seqüência completa de promotor ou porções do mesmo pode ser usada como uma sonda capaz de hibridizar especificamente com seqüências de promotor correspondentes. Para se alcançar a hibridização específica sob uma variedade de condições, tais sondas incluem seqüências que são únicas e têm, preferencialmente, um comprimento de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos, e mais preferencialmente um comprimento de pelo menos cerca de 20 nucleotídeos. Tais sondas podem ser usadas para amplificar seqüências de promotor correspondentes a partir de um organismo escolhido por meio do processo bem conhecido de reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica pode ser usada para isolar seqüências de promotor adicionais a partir de um organismo desejado ou como um ensaio diagnóstico para determinar a presença da seqüência de promotor em um organismo. Exemplos incluem o *screening* de hibridização de bibliotecas de DNA plaqueado (tanto em placas como em colônias; ver, por exemplo, Innis *et al* (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, eds., Academic Press).

Em geral, as seqüências que correspondem a uma seqüência de promotor da presente invenção e que hibridiza com uma seqüência de promotor aqui revelada será pelo menos

50% homóloga, 55% homóloga, 60% homóloga, 65% homóloga, 70% homóloga, 75% homóloga, 80% homóloga, 85% homóloga, 90% homóloga, 95% homóloga e até mesmo 98% homóloga ou mais com a seqüência revelada.

Os fragmentos de uma seqüência de promotor aqui revelados podem operar para promover a expressão pólen-preferida de uma seqüência de nucleotídeos isolada operacionalmente-ligada. Esses fragmentos compreenderão pelo menos cerca de 20 nucleotídeos contíguos, preferencialmente pelo menos cerca de 50 nucleotídeos contíguos, mais de preferência pelo menos cerca de 75 nucleotídeos contíguos, e até mais preferivelmente de pelo menos 100 nucleotídeos contíguos das seqüências de nucleotídeos do promotor particular aqui reveladas. Os nucleotídeos de tais fragmentos usualmente compreenderão a seqüência de reconhecimento TATA da seqüência de promotor particular. Tais fragmentos podem ser obtidos pelo uso de enzimas de restrição para clivar as seqüências de promotor de ocorrência natural aqui reveladas; pela síntese de uma seqüência de nucleotídeos a partir da seqüência de DNA de ocorrência natural; ou através do uso de tecnologia de PCR. Ver particularmente, Mullis *et al* (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350, e Erlich, ed. (1989) *PCR Technology* (Stockton Press, New York). Mais uma vez, as variantes desses fragmentos, tais como aqueles resultantes de mutagênese sítio-dirigida, estão englobadas pelas composições da presente invenção.

Portanto, estão englobadas as seqüências de nucleotídeos compreendendo pelo menos cerca de 20 nucleotídeos contíguos da seqüência apresentada na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO: 2. Essas seqüências podem ser isoladas por hibridização, PCR ou semelhantes. Tais seqüências englobam fragmentos capazes de dirigir a expressão pólen-preferida, fragmentos úteis como sondas para identificar seqüências semelhantes, assim como elementos responsáveis pela especificidade temporal ou de tecido.

As variantes biologicamente ativas da seqüência de promotor também estão englobadas pelas composições da presente invenção. Uma "variante" de regulação é uma forma modificada de um promotor em que uma ou mais bases foram modificadas, removidas ou adicionadas. Por exemplo, uma maneira rotineira de remover parte de uma seqüência de DNA é usar uma exonuclease em combinação com amplificação de DNA para produzir deleções *nested* unidirecionais de clones de DNA de dupla-fita. Um kit comercial para esta finalidade é vendido sob o nome de marca de Exo-Size™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Em resumo, este procedimento vincula a incubação de exonuclease III com DNA à remoção progressiva de nucleotídeos na direção 3´ para 5´ nos *overhangs* 5´, extremidades cegas ou cortadas no *template* de DNA. Entretanto, a exonuclease III é incapaz de remover nucleotídeos nos *overhangs* 3´, base-4. Digestos de um clone obtidos no tempo especificado com esta enzima produzem deleções *nested* unidirecionais.

Um exemplo de uma variante de seqüência de regulação é um promotor formado pela promoção de uma ou mais deleções em um promotor maior. A deleção da porção 5´ de um promotor até o *box* TATA perto do sítio do início da transcrição pode ser realizada sem abolir a atividade do promotor, como descrito por Zhu *et al.*, *The Plant Cell* 7: 1681-89 (1995). Tais variantes devem reter a atividade do promotor, particularmente a capacidade de dirigir a expressão em tecidos específicos. As variantes biologicamente ativas incluem, por exemplo, as seqüências de regulação nativas da invenção tendo uma ou mais substituições, deleções ou inserções de nucleotídeo. A atividade pode ser medida por análise Northern blot, medições de atividade repórter quando se usam fusões de transcrição, e semelhantes; ver, por exemplo, Sambrook *et al* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), aqui incorporado a título de referência.

As seqüências de nucleotídeos para os promotores pólen-preferidos revelados na presente invenção, assim como variantes e fragmentos das mesmas, são úteis na manipulação genética de qualquer planta quando estão operacionalmente ligados a uma seqüência de nucleotídeos isolada cuja expressão deve ser controlada para se alcançar uma resposta fenotípica desejada.

A seqüência de nucleotídeos operacionalmente ligada aos elementos de regulação aqui revelados pode ser uma seqüência antisense para um gene alvo. Pelo termo "seqüência antisense de nucleotídeos de DNA" tem-se a intenção de significar uma seqüência que está em orientação inversa à orientação normal 5´-para-3´ daquela seqüência de nucleotídeos. Quando transportada para uma célula de planta, a expressão da seqüência antisense de DNA evita a expressão normal da seqüência de nucleotídeos de DNA para o gene alvo. A seqüência antisense de nucleotídeos codifica um transcrito de RNA que é complementar a e capaz de hibridizar com o RNA mensageiro (mRNA) endógeno produzido por transcrição da seqüência de nucleotídeos de DNA para o gene alvo. Neste caso, a produção da proteína nativa codificada pelo gene alvo é inibida para se alcançar uma resposta fenotípica desejada. Portanto, as seqüências de regulação aqui reivindicadas podem ser operacionalmente ligadas a seqüências antisense de DNA para reduzir ou inibir a expressão de uma proteína nativa ou exógena na planta.

Muitas seqüências de nucleotídeos são conhecidas por inibir a formação ou função ou dispersão de pólen, sendo suficiente qualquer uma das seqüências que realizar essa inibição. Uma discussão sobre genes que podem causar impacto no desenvolvimento ou função apropriados está incluída na patente número US 6.399.856 e inclui os genes negativos dominantes tais como genes de citotoxina, genes de metilase e genes de inibição de crescimento. Os genes

negativos dominantes incluem o gene da toxina de cadeia-A de difteria (Czako e An (1991) *Plant Physiol.* 95 687-692); mutantes do cilo de divisão celular, tais como CDC em milho (Colasanti et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3377-3381); o gene WT (Farmer et al., (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3, 723-728); e P68 (Chen et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 315-319). Um gene apropriado também pode codificar uma proteína envolvida na inibição do desenvolvimento de pistilo, interações pólen estigma, crescimento ou fertilização do tubo de pólen, ou uma combinação dos mesmos. Adicionalmente, os genes que interferem com a acumulação normal de amido em pólen ou afetam o equilíbrio osmótico dentro do pólen também pode ser apropriado. Eles podem incluir, por exemplo, o gene de alfa-amilase de milho, o gene beta-amilase de milho, as enzimas de des-ramificação, tais como *Sugary1* e *pullulanase*, glucanase, e SacB.

Em uma concretização ilustrativa, é usado o gene DAM-metilase, cujo produto de expressão catalisa a metilação de resíduos de adenina no DNA da planta. As adeninas metiladas não afetarão a viabilidade da célula e serão encontradas somente no tecido no qual o gene da DAM-metilase é expressado porque tais resíduos metilados não são encontrados endogenamente no DNA da planta. Os exemplos dos assim-chamados genes "citotóxicos" são discutidos acima e podem incluir, mas não ficarem limitados a, gene pelE da pectato liase, oriundo de *Erwinia chrysanthermi* (Kenn et al (1986) *J. Bacteriol* 168:595); gene da toxina de cadeia-A de

difteria (Greenfield et al (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6853, Palmiter et al (1987) *Cell* 50:435); gene T-urf13 oriundo dos genomas mitocondriais de milho cms-T (Braun et al (1990) *Plant Cell* 2:153; Dewey et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5374); gene de toxina CytA de *Bacillus thuringiensis israeliensis* que causa a ruptura da membrana da célula (McLean et al (1987) *J. Bacteriol* 169:1017, patente número US 4.918.006); DNAses, RNAses, (patente número US 5.633.441); proteases, ou genes que expressam o RNA anti-sense.

Adicionalmente, os métodos da invenção são úteis em reter a condição recessiva homozigota dos caracteres diferentes daqueles que conferem fertilidade à planta. O gene de interesse que restaura a condição deve ser introduzido em uma planta ligado a uma seqüência de nucleotídeos que inibe a formação, função ou dispersão de pólen e que pode estar adicionalmente ligado a um promotor de gameta masculino tecido-preferido e a um gene codificante de um marcador, por exemplo, um marcador semente-específico. O pólen viável produzido pela planta na qual o constructo é introduzido contém somente o alelo recessivo do gene de interesse e nenhuma das seqüências de transgene de restauração. Metade dos gametas femininos da planta transgênica hemizigota contém o transgene e pode ser auto-polinizada, ou polinizada por uma planta compreendendo os alelos recessivos. Metade das sementes produzidas portará o transgene e pode ser identificada por meio do marcador ligado. A condição hemizigota pode ser mantida

pela auto-fecundação da planta hemizigota, metade dos filhos conterá o transgene e, portanto, o caractere de interesse.

Os genes de interesse são reflexivos dos mercados e interesses comerciais daqueles envolvidos no desenvolvimento da cultura. Culturas e mercados de interesse mudam e, à medida que as nações em desenvolvimento abrem seus mercados ao mundo, culturas e tecnologias novas também emergirão. Adicionalmente, de acordo com o nosso entendimento de caracteres e características agronômicas, tais como produtividade e aumentos de heterose, a escolha de genes para transformação mudará correspondentemente.

A regulação de fertilidade masculina é necessariamente medida em termos de seu efeito sobre as células individuais. Por exemplo, é requerida a supressão de 99,99% de grãos de pólen para se alcançar esterilidade confiável para uso comercial. Entretanto, a supressão ou restauração bem sucedida de expressão de outros caracteres pode ser realizada com mais baixa estringência. Dentro de um tecido particular, por exemplo, a expressão em 98%, 95%, 90%, 80%, ou de menos células pode resultar no fenótipo desejado.

Esta invenção tem utilidade para uma diversidade de genes, não limitados àqueles que afetam a capacidade reprodutora. Categorias gerais de genes de interesse

incluem, por exemplo, aqueles genes envolvidos em informação, tal como dedos de zinco (*zinc fingers*), aqueles envolvidos em comunicação, tal como quinases, e aqueles envolvidos com funções do organismo (*housekeeping*), tal como as proteínas de choque de calor. Categorias mais específicas de transgenes, por exemplo, incluem genes codificantes de importantes características para a agronomia, arquitetura de plantas, dinâmica de desenvolvimento e iniciação do crescimento reprodutivo, resistência a insetos, resistência a doenças, resistência a hebicidas, esterilidade, características de grão e produtos comerciais. Os genes de interesse incluem, em geral, aqueles envolvidos com metabolismos de óleo, amido, carboidrato ou de nutriente, asssim como, aqueles que afetam o tamanho do grão, a carga de sacarose e semelhantes. Caracteres agronomicamente importantes tal como teor de óleo, de amido, e de proteína podem ser geneticamente alterados em adição ao uso de métodos de melhoramento tradicional. As modificações incluem o aumento do teor de ácido oléico, óleos saturados e insaturados, níveis aumentados de lisina e enxofre, provisão de aminoácidos essenciais e também modificação de amido. As modificações da proteína hordotionina estão descritas nas patentes números US 5.703.049, US 5.885.801, US 5.885.802 e US 5.990.389. Um outro exemplo é a proteína de semente rica em lisina e/ou enxofre codificada pela albumina 2S de soja descrita na patente número US 5.850.016, e o inibidor de quimotripsina oriundo de cevada, descrito em Williamson et al., (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:99-106. Outros importantes

genes codificam fatores de crescimento e fatores de transcrição.

Os caracteres agronômicos podem ser melhorados pela alteração da expressão de genes que afetam o crescimento e desenvolvimento, especialmente durante o estresse ambiental. Esses incluem, por exemplo, genes codificantes de enzimas de biossíntese de citocinina, tal como a isopentenil transferase; genes codificantes de enzimas catabólicas de citocinina, tal como citocinina oxidase; genes codificantes de polipeptídeos envolvidos na regulação do ciclo da célula, tal como o CyclinD ou o cdc25; genes codificantes de receptores ou sensores de citocinina, tais como CRE1, CKI1, e CKI2, histidina fosfo-transmissores, ou reguladores de resposta a citocinina.

Exemplos adicionais incluem resistência a doenças e herbicidas (por exemplo genes de detoxificação de fumonisina (patente número US 5.792.931); genes de avirulência e de resistência a doenças (Jones *et al*, (1994) *Science* 266:789; Martin *et al*, (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos *et al*, (1994) *Cell* 78:1089); mutantes de acetolato sintase (ALS) que levam a resistência a herbicidas como fosfinotricina ou basta (por exemplo, gene bar); e resistência a glifosato (gene EPSPS)); fixação de carbono, como fosfoenolpiruvato carboxilase (PepC) ou ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco ativase, RCA); características desejáveis para

processamento ou processar os produtos como alto teor de óleo (por exemplo patente número US 6.232.529), óleos modificados (por exemplo genes de ácido graxo dessaturase (patente número US 5.952.544; WO 94/11516)); amidos modificados (por exemplo ADPG pirofosforilases (AGPase), amido sintases (SS), enzimas de ramificação do amido (SBE), e enzimas de desramificação do amido (SDBE)); e polímeros ou bioplásticos (por exemplo patente número US 5.602.321, beta-cetotiolase, polihidroxibutirato sintase, e acetoacetil-CoA redutase (Schubert *et al*, (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) facilitam expressão de polihidroxialcanoatos (PHAs)); a revelação dos quais está neste incorporado por referência. Os métodos da presente invenção poderiam também ser combinados com métodos para tecnologia de transformação, como regulação de ciclo celular ou direcionamento de genes (por exemplo WO 99/61619, WO 00/17364, e WO 99/25821), a divulgação dos quais está neste incorporado por referência.

Os genes de resistência a insetos podem codificar resistência a pragas que causam grandes estragos na produtividade tais como lagarta do cartucho, lagarta rosca, Broca de Milho Europeu, e semelhantes. Tais genes incluem, por exemplo: genes de endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, patentes números US 5.366.892; US 5.747.450; US 5.737.514; US 5.723.756; US 5.593.881; Geiser *et al* (1986) *Gene* 48:109; lectinas, Van Damme *et al* (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825; e semelhantes.

Genes codificantes de caracteres de resistência a doença incluem: genes de destoxificação, tais como contra fumonisina (WO 9606175, depositado em 7 de junho de 1995); genes de avirulência (avr) e de resistência a doenças (R), Jones *et al* (1994) *Science* 266:789; Martin *et al* (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos *et al* (1994) *Cell* 78:1089; e semelhantes.

Caracteres comerciais também podem ser codificados em gene(s) que podem alterar ou aumentar, por exemplo, amido para a produção de papel, de têxteis e de etanol, ou prover a expressão de proteínas com outros usos comerciais. Um outro uso comercial importante de plantas transformadas é a produção de polímeros e bioplásticos tais como os descritos na patente número US 5.602.321, publicada em 11 de fevereiro de 1997. Genes tais como o de B-cetotiolase, de PHBase (poliidroxibutirato sintase) e acetoacetil-CoA redutase (ver Schubert *et al* (1988) *J. Bacteriol* 170(12):5837-5847) facilitam a expressão de poliidroxialcanoatos (PHAs).

Produtos exógenos incluem enzimas e produtos de planta, assim como aqueles oriundos de outras fontes, incluindo procariotes e eucariotes. Tais produtos incluem enzimas, cofatores, hormônios e semelhantes. Pode ser melhorado o nível de proteínas em semente, particularmente as proteínas de semente modificada tendo distribuição melhorada de aminoácidos para aperfeiçoar o valor nutritivo

da semente. Isto é alcançado pela expressão de tais proteínas tendo teor aperfeiçoado de aminoácidos.

Os cassetes de expressão da invenção, compreendendo um promotor e seqüência de nucleotídeos isolada de interesse, também podem incluir, na extremidade 3´ da seqüência de nucleotídeos isolada de interesse, uma região de terminação de transcrição e de tradução funcional em plantas. A região de terminação pode ser nativa com a seqüência de nucleotídeos do promotor do cassete, pode ser nativa com a seqüência de DNA de interesse, ou pode ser derivada de uma outra fonte.

Outras regiões de terminação convenientes estão disponíveis a partir do plasmídeo-Ti de *A. tumefaciens*, tal como as regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Ver também: Guerineau *et al* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al* (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al* (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe *et al* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al* 1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; Joshi *et al* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639. Os cassetes de expressão podem adicionalmente conter seqüências 5´ líder. Tais seqüências líder podem atuar para aperfeiçoar a tradução. Os líderes de tradução são conhecidos do estado da técnica e incluem: líderes de picornavirus, por exemplo: lider EMCV (região 5´ não-codificante de Encefalomiocardite), Elroy-Stein *et al*

(1989) *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA 86:6126-6130; lideres de *potyvirus*, por exemplo, lider TEV (Tobacco Etch Virus), Allison *et al* (1986); lider MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus), *Virology* 154:9-20; proteína humana de ligação a imunoglobulina de cadeia-longa (BiP), Macejak *et al* (1991) *Nature* 353:90-94; lider não-traduzido oriundo do mRNA da proteína de capa do vírus de mosaico da alfafa (AMV RNA 4), Jobling *et al* (1987) *Nature* 325:622-625); lider de virus de mosaico do tabaco (TMV), Gallie *et al* (1989) *Molecular Biology of RNA*, pages 237-256; e lider de vírus de milho clorótico manchado (MCMV) Lommel *et al* (1991) *Virology* 81:382-385. Ver também Della-Cioppa *et al* (1987) *Plant Physiology* 84:965-968. O cassette também pode conter seqüências para aperfeiçoar a tradução e/ou estabilidade do mRNA, tal como introns.

Nessas circunstâncias, em que é desejável ter o produto expressado da seqüência de nucleotídeos isolada dirigido a uma organela particular, especialmente o plastídeo, amiloplasto ou para o reticulo endoplásmico ou secretado na superfície da célula ou extracelularmente, o cassete de expressão pode ainda compreender uma seqüência codificante para o peptídeo de trânsito. Tais peptídeos de trânsito são bem conhecidos no estado da técnica e incluem, mas não ficam limitados a: o peptídeo de trânsito para a proteína portadora de acila, a pequena subunidade de RUBISCO, a EPSP sintase de planta e semelhantes.

Na preparação do cassete de expressão, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados de modo a prover as seqüências de DNA na orientação própria e, quando apropriado, no quadro de leitura próprio. Para essa finalidade, podem ser empregados adaptadores e linkers para juntar os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem estar envolvidas para prover os sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, ou semelhantes. Para este propósito podem estar envolvidas a mutagênese *in vitro*, o reparo de primer, digestos de restrição, anelamento e re-substituições, tais como transições e transversões.

Os termos a seguir são usados para descrever as relações de seqüência entre dois ou mais ácidos nucléicos ou polinucleotídeos: (a) "seqüência de referência", (b) "janela de comparação", (c) "percentagem de identidade de seqüência" e (d) "identidade substancial".

(a) como aqui usado, "seqüência de referência" é uma seqüência definida usada como base para a comparação de seqüência. Uma seqüência de referência pode ser um subconjunto ou a integridade de uma seqüência especificada; por exemplo, um segmento de uma seqüência completa de promotor, ou a seqüência completa de promotor;

(b) como aqui usada, a "janela de comparação" faz referência a um segmento contíguo e especificado de uma seqüência de polinucleotídeo, em que a seqüência de

polinucleotídeo pode ser comparada com uma seqüência de referência e em que a porção da seqüência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (ou seja, intervalos (*gaps*)) comparada com a seqüência de referência (a qual não compreende adições ou deleções) para o alinhamento ótimo de duas seqüências. Em geral, a janela de comparação tem um comprimento de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos e opcionalmente pode ter um comprimento de 30, 40, 50, 100 ou mais nucleotídeos contíguos. Aqueles especialistas na técnica entendem que para evitar uma alta similaridade em relação à seqüência de referência devido à inclusão de *gaps* na seqüência de polinucleotídeo, é tipicamente introduzida uma penalidade de *gap* e é subtraída do número de emparelhamentos (*matches*).

(c) como aqui usado, a "percentagem de identidade de seqüência" significa o valor determinado por comparação de duas seqüências alinhadas de modo ótimo ao longo da janela de comparação, em que a porção da seqüência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (ou seja, *gaps*) quando comparada com a seqüência de referência (a qual não compreende adições ou deleções) para o alinhamento ótimo das duas seqüências. A percentagem é calculada para se determinar o número de posições nas quais a base idêntica de ácido nucléico ocorre em ambas seqüências para produzir o número de posições emparelhadas, dividindo o número de posições emparelhadas pelo número total de posições na janela de comparação e

multiplicando o resultado por 100 para produzir a percentagem de identidade de seqüência.

(d) o termo "substancial identidade" de seqüências de polinucleotídeo significa que o polinucleotídeo compreende uma seqüência que possui pelo menos 70% de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90% e mais de preferência pelo menos 95%, comparado com a seqüência de referência usando um dos programas de alinhamento descritos que utilizam parâmetros padrão.

Os métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem conhecidos no estado da técnica. As comparações de genes podem ser determinadas através da realização de buscas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., *et al.*, (1993) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; ver também www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), sob parâmetros de *default*, para identificar em relação a seqüências contidas na base de dados BLAST "GENEMBL". Uma seqüência pode ser analisada para identidade em relação a seqüências de DNA disponíveis ao público contidas na base de dados GENEMBL usando o algoritmo BLASTN sob parâmetros de *default*.

Para finalidades de definição da presente invenção, é usado o GAP (*Global Alignment Program*). O GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970) para encontrar o alinhamento de duas seqüências

completas que maximiza o número de emparelhamentos e minimiza o número de *gaps*. Os valores de penalidade de criação do *default* de *gap* e os valores de penalidade de extensão de *gap* na Versão 10 do Wisconsin Package® (Accelrys, Inc., San Diego, CA) para seqüências de proteína são 8 e 2, respectivamente. Para seqüências de nucleotídeo a penalidade de criação de *default* de *gap* é 50, enquanto que a penalidade de extensão de *default* de *gap* é 3. A similaridade percentual é a quantidade em percentagem dos símbolos que são similares. Os símbolos que vão além dos *gaps* são ignorados. A similaridade é contabilizada quando o valor da matriz de escore para um par de símbolos é maior ou igual a 0,50, a similaridade de base. A matriz de escore usada na Versão 10 do Wisconsin Package® (Accelrys, Inc., San Diego, CA) é BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

Grandes quantidades de ácidos nucléicos da presente invenção podem ser produzidas por replicação em uma célula hospedeira apropriada. Os fragmentos naturais ou sintéticos de ácido nucléico codificantes de um fragmento desejado serão incorporados em constructos de ácido nucléico recombinante, usualmente constructos de DNA, capazes de introdução e replicação em uma célula procariótica ou eucariótica. Usualmente, os constructos de ácido nucléico serão apropriados para replicação em um hospedeiro unicelular, tal como levedura ou bactéria, mas também se pode ter a intenção de introdução em (com ou sem integração dentro do genoma) mamífero ou planta ou outras linhagens de

células eucarióticas. A purificação de ácidos nucléicos produzidos pelos métodos da presente invenção está descrita, por exemplo, em Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) ou Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley and Sons, NY (1992).

Os constructos de ácido nucléico, preparados para introdução em um hospedeiro procariótico ou eucariótico, podem compreender um sistema de replicação reconhecido pelo hospedeiro, incluindo o fragmento de ácido nucléico almejado codificante de uma proteína desejada, e, preferencialmente, também incluirão as seqüências de regulação da iniciação de tradução operacionalmente ligadas ao segmento codificante da proteína. Os vetores de expressão podem incluir, por exemplo, uma origem de replicação ou seqüência autonomamente replicante (ARS) e seqüências de controle de expressão, um promotor, um *enhancer* e sítios necessários para o processamento da informação, tais como sítios de ligação ao ribossomo, sítios de processamento de RNA, sítios de poliadenilação, seqüências terminadoras de transcrição e seqüências de estabilização do mRNA. Quando apropriado, sinais de secreção também podem estar incluídos. Tais vetores podem ser preparados pelos meios de técnicas recombinantes padrão bem conhecidas no estado da técnica e descritas, por exemplo, em Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) ou Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley and Sons, NY (1992).

Vetores para introdução de genes para recombinação e para manutenção extra-cromossômica são conhecidos no estado da técnica e qualquer vetor apropriado pode ser usado. Os métodos para introduzir DNA em células, tais como eletroporação, co-precipitação com fosfato de cálcio, e transdução viral são conhecidos no estado da técnica e a escolha do método está dentro da competência de qualquer técnico no assunto (Robbins, Ed., Gene Therapy Protocols, Human Press, NJ (1997)).

Os sistemas de transferência de gene conhecidos no estado da técnica podem ser úteis na prática da presente invenção. Eles incluem métodos de transferência viral e não-viral. Inúmeros vírus têm sido usados como vetores de transferência de gene, incluindo o polioma, ou seja, o SV40 (Madzak et al., (1992) J. Gen. Virol., 73:1533-1536), adenovírus (Berkner, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:39-61; Berkner et al., (1988) Bio Techniques, 6:616-629; Gorziglia et al., (1992) J. Virol., 66:4407-4412; Quantin et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584; Rosenfeld et al., (1992) Cell, 68:143-155; Wilkinson et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20:2233-2239; Stratford-Perricaudet et al., (1990) Hum. Gene Ther., 1:241-256), vírus vaccinia (Mackett et al., (1992) Biotechnology,

24:495499), vírus adeno-associado (Muzyczka, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:91-123; Ohi et al., (1990) Gene, 89:279-282), vírus de herpes incluindo o HSV e EBV (Margolskee, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:67-90; Johnson et al., (1992) J. Virol., 66:2952-2965; Fink et al., (1992) Hum. Gene Ther., 3:11-19; Breakfield et al., (1987) Mol. Neurobiol., 1:337-371; Fresse et al., (1990) Biochem. Pharmacol., 40:2189-2199), e retrovírus de aves (Brandyopadhyay et al., (1984) Mol. Cell Biol., 4:749-754; Petropouplos et al., (1992) J. Virol., 66:3391-3397), de murino (Miller, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:1-24; Miller et al., (1985) Mol. Cell Biol., 5:431-437; Sorge et al., (1984) Mol. Cell Biol., 4:1730-1737; Mann et al., (1985) J. Virol., 54:401-407), e de origem humana (Page et al., (1990) J. Virol., 64:5370-5276; Buchschalcher et al., (1992) J. Virol., 66:2731-2739).

Os métodos de transferência de gene não-viral conhecidos no estado da técnica incluem técnicas químicas, tais como co-precipitação com fosfato de cálcio (Graham et al., (1973) Virology, 52:456-467; Pellicer et al (1980), Science, 209:1414-1422), técnicas mecânicas, por exemplo, microinjeção (Anderson et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5399-5403; Gordon et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:7380-7384; Brinster et al., (1981) Cell, 27:223-231; Constantini et al., (1981) Nature, 294:92-94), transferência de membrana fusão-mediada via lipossomos (Felgner et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417; Wang et al., (1989) Biochemistry, 28:9508-

9514; Kaneda et al., (1989) J. Biol. Chem., 264:12126-12129; Stewart et al., (1992) Hum. Gene Ther., 3:267-275; Nabel et al., (1990) Science, 249:1285-1288; Lim et al., (1992) Circulation, 83:2007-2011), e captação direta de DNA e transferência receptor-mediada de DNA (Wolff et al., Science, (1990) 247:1465-1468; Wu et al., (1991) BioTechniques, 11:474-485; Zenke et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655-3659; Wu et al., (1989) J. Biol. Chem., 264:16985-16987; Wolff et al., (1991) BioTechniques, 11:474485; Wagner et al., 1990; Wagner et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:42554259; Cotten et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4033-4037; Curiel et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850-8854; Curiel et al., (1991) Hum. Gene Ther., 3:147-154).

O técnico no assunto facilmente considerará que os métodos aqui descritos são aplicáveis a outras espécies não especificamente exemplificadas, incluindo tanto plantas como outros organismos não-humanos. Os exemplos a seguir visam a ilustrar, mas não limitar, a invenção.

EXEMPLO 1

EXPRESSÃO DO PROMOTOR DE RNA *HAIRPIN* AFETA A FERTILIDADE DA PLANTA

Este exemplo demonstra que a fertilidade ou fertilidade potencial de plantas pode ser alterada pela expressão de moléculas de RNA *hairpin* (hpRNA) específicas

para os promotores de genes que codificam proteínas envolvidas em rotas de fertilidade masculina.

Os constructos de promotor de hpRNA foram gerados por ligação a um promotor de ubiquitina com relação a uma repetição invertida do promotor desejado, incluindo um segmento do promotor *NOS* entre as seqüências de repetição invertidas. A expressão de cada constructo gerou um hpRNA específico para um dos seguintes promotores: MS45, 5126, BS7, SB200, e PG47. As moléculas de ácido nucléico e métodos para preparar os constructos e milho transformante foram previamente descritos (Cigan et al (2001) *Sex Plant Reprod.* 14:135-142). A progênie (geração T1) das plantas transformadas (T0) foi analizada.

Dos 32 eventos de transformação compreendendo o hpRNA específico para o promotor do gene MS45, 29 produziram plantas T0 que eram estéreis masculinas.

Dos 32 eventos de transformação compreendendo o hpRNA específico para o promotor do gene 5126, 29 produziram plantas T0 que eram estéreis masculinas.

Dos 32 eventos de transformação compreendendo o hpRNA específico para o promotor do gene BS7, 23 produziram plantas T0 que produziram uma pequena quantidade de pólen não-viável (fenótipo "*breaker*") ou eram férteis masculinas,

mas produziram somente uma pequena quantidade de pólen viável (fenótipo "*shedder*").

De 31 eventos de transformação compreendendo o hpRNA específico para o promotor do gene SB200, 13 produziram plantas T0 de fenótipo *breaker* ou fenótipo *shedder*.

De 24 eventos de transformação compreendendo o hpRNA específico para o promotor do gene PG47 ligado a um constructo para resistência a herbicida, 15 revelaram não ter havido transmissão de resistência a herbicida para as mudas T1 quando se usa pólen oriundo dos transformantes primários. Isto é consistente com a expressão pós-meiótica esperada do PG47.

RNA de antera de plantas expressando os vários hpRNAs foi analisado por northern blot. Para cada alvo, seis eventos independentes foram analisados na geração T1 para se determinar se a expressão de hpRNA reduziu os níveis de RNA no estado estacionário dos genes alvo. As anteras foram estagiadas na liberação tétrade para o estágio uninucleado inicial do desenvolvimento do micrósporo. Foi isolado o RNA Poly A^+, separado por eletroforese, transferido para membranas, e hibridizado seqüenialmente com sondas específicas para MS45, 5126, BS7, SB200, NOS, e actina (controle de quantidade de RNA). Nenhum transcrito de MS45, 5126, ou BS7 foi detectado em plantas expressando o hpRNA específico para esses promotores endógenos. Somente uma

leve redução de RNA de SB200 foi observada em plantas expressando o hpRNA de SB200.

A análise imunoblot de proteínas de proteínas de antera também foi realizada essencialmente como descrito anteriormente (Cigan et al., (2001) *Sex Plant Reprod.* 14:135-142). Para cada alvo, seis eventos independentes foram analisados na geração T1 para determinar se a expressão do hpRNA do promotor reduziu os níveis de proteína no estado estacionário dos genes alvo. As anteras foram estagiadas como acima mencionado, em base de tampão Laemelli, separadas por eletroforese, e reagidas seqüencialmente com anticorpos específicos para proteína de MS45, BS7, SB200 ou 5126. De modo semelhante aos resultados de northern blot, nenhuma proteína de MS45, 5126, ou BS7 foi detectada em plantas expressando o hpRNA específico para esses promotores endógenos, e somente uma leve redução de proteína de SB200 foi observada por eventos compreendendo o hpRNA de SB200.

Esses resultados demonstram que a expressão do hpRNA do promotor pode reprimir seletivamente a expressão do gene endógeno em células de planta. Adicionalmente, os resultados demonstram que a repressão de diferentes genes envolvidos na esterilidade masculina de plantas pode, de maneira variada, afetar o fenótipo de planta, incluindo o grau de fertilidade masculina.

EXEMPLO 2

EXPRESSÃO DO PRODUTO EXÓGENO DO GENE MS45 RESTAURA A FERTILIDADE

Este exemplo demonstra que plantas tornadas estéreis-masculinas, pela expressão de um constructo *hairpin* do promotor MS45, pode ter restaurada a sua fertilidade pela expressão do constructo exógeno do gene MS45.

Foram preparados constructos contendo a seqüência codificante de MS45 operacionalmente ligada a um promotor heterólogo 5126, SB200 ou BS7 de ubiquitina (UBI); esses constructos foram introduzidos em células de planta ms45ms45. As plantas regeneradas e sua progênie eram férteis, demonstrando que o promotor nativo do MS45 pode ser substituído por um promotor constitutivo ou antera-preferido para conferir um fenótipo fértil-masculino ao mutante de milho ms45 (ver também Cigan et al., (2001) *Sex Plant Reprod.* 14:135-142).

Adicionalmente, as plantas contendo o constructo UBI:MS45 ou 5126:MS45 foram cruzadas com plantas que eram estéreis masculinas devido à expressão de um hpRNA do promotor do gene MS45. A progênie foi testada por PCR em relação à presença do constructo hp e UBI:MS45 ou 5126:MS45. A análise de hibridização de RNA foi conduzida e os fenótipos foram contabilizados.

A análise de northern blot de RNA obtida a partir de folhas das plantas da progênie revelaram que o MS45 foi expressado a partir do promotor de ubiquitina em 7 de 12 progênies contendo hp obtidas do cruzamento UBI:MS45. Adicionalmente, a expressão de MS45 a partir do promotor UBI teve correlação com a fertilidade observada nas plantas da progênie. Esses resultados indicam que o MS45 é expressado a partir do promotor constitutivo de ubiquitina, e que a expressão constitutiva do produto de gene MS45 confere fertilidade masculina às plantas da progênie.

Adicionalmente, foi analisado o RNA de antera oriundo dessas plantas de milho MS45hp contendo 5126:MS45, BS7:MS45, ou UBI:MS45. As anteras foram estagiadas na liberação tétrade para o estágio uninucleado inicial do desenvolvimento do micrósporo, e o RNA de poly A^+ foi coletado, submetido a eletroforese e hibridizado seqüencialmente com sondas para MS45, SB200, e BS7. O MS45 foi expressado em anteras das plantas da progênie fértil-masculina, independente de serem dirigidas por promotor constitutivo UBI ou por promotores antera-específicos 5126 ou BS7, com regulagem da coleção de antera provavelmente afetando a força do sinal. Nenhum RNA de MS45 foi observado nas plantas estéreis-masculinas contendo *hairpin*-somente. Esses resultados demonstram que a repressão da expressão de MS45 devido ao hpRNA de MS45 pode ser suplantada pela expressão de MS45 a partir de um promotor heterólogo que dirige a expressão pelo menos em células de antera.

O promotor que expressa o gene MS45 pode ser derivado de uma fonte diferente de milho, e pode ser, por exemplo, qualquer promotor de planta capaz de transcrever o MS45 de modo que a expressão da unidade de transcrição torna as plantas férteis masculinas. Por exemplo, foram isolados e identificados os homólogos de arroz e *Arabidopsis* dos genes MS45, 5126, BS7 e MS26 de milho. Veja a Figura 1 para as coordenadas cromossomais fornecendo informação de sequência para MS45, MS26, e 5126 em arroz e Arabidopsis, e BS7 em Arabidopsis. Para BS7 em arroz, ver SEQ ID NO: 3. Acima de tudo, há significtiva similaridade de sequências codificantes entre as espécies, com conservação de regiões de introns. É importante ressaltar que os promotores correspondentes de arroz e de milho são aproximadamente 50 a 60% idênticos de forma gerla, com regiões até 85% idênticas, sugerindo que esses promotores podem funcionar suficientemente em *tapetum* de milho para transcrever o gene MS45.

Para testar isso, cada um dos promotores MS45 de arroz, 5126 de arroz, BS7 de arroz, MS26 de arroz e MS45 de Arabidopsis, 5126 de Arabidopsis e BS7 de Arabidopsis foram fundidos à região codificante do MS45 de milho e testados em relação à capacidade do constructo de conferir fertilidade quando transformado em mutantes ms45ms45. Usando este sistema de teste, foi observada uma alta freqüência de plantas férteis masculinas para todos os quatro constructos.

Em certos aspectos, é vantajoso usar promotores de não-milho para expressar o gene MS45. Por exemplo, quando os hpRNAs do promotor oriundos da mesma espécie reduzem a função do gene alvo de modo que a planta seja não-viável ou não-reprodutora, um promotor oriundo de uma espécie diferente pode ser usado para expressar no modo de transcrição a função do gene complementar (por exemplo, MS45), circundando, portanto, esse problema potencial. Mais que isso, um constructo de hpRNA pode ser gerado para alvejar o promotor de não-milho usado no cassete de expressão do MS45 para reprimir a expressão do gene MS45, como um meio de reduzir ou abolir a função e tornar a planta masculina estéril. Por exemplo, uma planta recessiva homozigota ms45 pode ser transformada com um homólogo de promotor de milho MS45 que dirige a expressão do gene MS45 (MS45r::MS45), tornando a planta fértil masculina. Para reprimir a expressão deste cassete MS45r::MS45, uma segunda planta de milho pode ser gerada, a qual é heterozigota em relação à mutação do MS45 de milho e expressa um hpRNA do promotor MS45r. Como não há equivalente das seqüências alvo do promotor endógeno de arroz MS45 nesta planta de milho, esta planta seria fértil masculina. Esta segunda planta pode ser cruzada com a planta homozigota ms45 contendo o constructo MS45r::MS45, e a progênie homozigota ms45 recessiva pode ser submetida a *screening*, com relação ao MS45r::MS45, dos constructos de hpRNA de MS45r. Nesta situação, a função do gene MS45r::MS45 é reprimida pela

presença e expressão do MS45r hpRNA, resultando em uma planta estéril-masculina.

O uso de tais constructos é sustentado pela descoberta de que a expressão do hp do promotor 5126 de arroz em milho não resulta em plantas estéreis masculinas. Este resultado é contrário aos resultados obtidos usando um hp do promotor 5126 de milho (ver Exemplo 1) e sugere que a expressão do *hairpin* do promotor 5126 de arroz é incapaz de reprimir o gene endógeno 5126 de milho.

EXEMPLO 3

RNA *HAIRPIN* ESPECÍFICO DE PROMOTOR REPRIME A TRANSMISSÃO DE RESISTÊNCIA A HERBICIDA TRANSGENE-MEDIADA

Este exemplo demonstra que pólen de plantas hemizigotas com relação a um constructo *hairpin* de UBI:PG47 é não-viável, como determinado pela não-transmissão de resistência a hebicida para alogâmicas T1 quando um gene de resistência a herbicida está ligado ao constructo *hairpin* de PG47.

Um hpRNA específico para o promotor do gene PG47 compreendendo uma repetição invertida do promotor do gene PG47 dirigido por um promotor de ubiquitina (UBI:PG47hp), ligado a um constructo do 35S:PAT, foi introduzido em

células de planta. O pólen de plantas expressando o transgene, representando 24 eventos de transformação de baixo número de cópias ou de cópia única, for transportado para espigas de plantas de milho do tipo selvagem. A semente presente na espiga foi muito boa, e comparável àquela observada quando o pólen do tipo selvagem foi usado. Para cada evento, 32 sementes foram plantadas no solo, e as mudas foram borrifadas, 5 dias de pós-germinação, com o herbicida 2X LIBERTY™ para detectar a transmissão do UBI:PG47hp ligado ao 35S:PAT.

Era esperado que se o hpRNA PG47-específico funcionou na divisão pós-meiótica de micrósporos, então a viabilidade seria normal, e 50% do pólen portaria o transgene, provendo resistência a herbicida em 50% da progênie. No entanto, se a função do PG47 é requerida para a viabilidade do pólen, e o constructo *hairpin* pode reprimir a expressão do produto do gene PG47, então 50% dos grãos de pólen seriam não-viáveis; em todo o pólen viável estaria ausente o transgene que seria capaz de transmitir resistência a herbicida. Os constructos não-funcionais UBI:PG47hp seriam detectáveis pela presença de plantas resistentes a herbicida.

Quinze dos 24 eventos testados foram sensíveis a herbicida. Este resultado demonstra que os constructos de UBI:PG47hp reprimem a expressão do gene PG47 em pólen, tornando 50% do pólen não-viável e evitando a transmissão

da resistência a herbicida operacionalmente ligada ao constructo de repressão.

EXEMPLO 4

PLANTAS CONTENDO RNAs *HAIRPIN* ESPECÍFICOS DE PROMOTOR MÚLTIPLO REPRIMEM PROMOTORES ALVO MÚLTIPLOS

Plantas contendo 5126HP (ou seja, um transgene codificante de hpRNA do promotor 5126) são usadas como receptoras de pólen de plantas que expressam o BS7HP. Em plantas contendo ambos 5126HP e BS7HP, a expressão endógena do 5126 e BS7 é reprimida, levando a um fenótipo de esterilidade mais forte do que o observado com qualquer dos constructos sozinho. As plantas são selecionadas para conter o 5126 ou o BS7 ou ambos e são avançadas na maturidade, e os fenótipos de fertilidade dessas plantas resultantes são determinados.

Alternativamente ou em adição ao cruzamento como um meio para combinar constructos de *hairpin*, um dos ditos constructos, por exemplo, o 5126HP, pode ser colocado sob controle de transcrição de um promotor induzível. Na ausência da indução, essas plantas contendo BS7HP são capazes de produzir suficiente pólen para si. Entretanto, sob indução do 5126HP, essas plantas são estéreis masculinas e podem ser usadas como femininas durante a produção de híbrido. Este processo depende da expressão combinada dos constructos *hairpin* (HPs) para tornar uma

planta infértil, apesar de a expressão de somente um dos HPs não conferir esterilidade.

ico promotor. Por exemplo, a região do promotor 5126 pode ser justaposta à região do promotor BS7 e ambas são colocadas sob o controle de transcrição de um único promotor de ubiquitina ou outro promotor constitutivo, promotor desenvolvimento- ou tecido-preferido, resultando na expressão de um RNA contendo um *hairpin* híbrido 5126 e BS7 que dirige a repressão de ambos os genes endógenos 5126 e BS7. Qualquer combinação e quantidade dos vários promotores que têm como alvo múltiplos e diferentes promotores podem ser usados no esquema. Por exemplo, podem ser combinados um promotor que regula genes de altura de planta e um promotor importante para o processo de reprodução, resultando em plantas estéreis tendo estatura baixa.

EXEMPLO 5

MANUTENÇÃO ENDOGÂMICA E PRODUÇÃO HÍBRIDA DE PLANTAS CONTENDO RNAs *HAIRPIN* PROMOTOR-ESPECÍFICO REPRIMINDO PROMOTORES ALVO E CONSTRUCTOS DE COMPLEMENTAÇÃO

Este exemplo demonstra como uma planta endogâmica contendo dois constructos, um constructo de RNA *hairpin* (hpRNA) dominante específico para um promotor e um gene MS45 expressado a partir de um promotor, como um promotor tecido-específico ou constitutivo, pode ser mantida e usada

na produção de fêmeas estéreis masculinas para a produção de híbrido.

Plantas endogâmicas A1 e A2 são ambas recessivas homozigotas ms45ms45. A fertilidade é restaurada para as plantas endogâmicas A1 pela introdução de um transgene expressando a região codificante de MS45 operacionalmente ligada a um promotor 5126. As plantas endogâmicas A1 também contêm um constructo expressando o BS7HP. Essas plantas podem ser auto-fecundadas e a linha gem A1, homozigota para os insertos de transgene, é mantida independentemente da endogâmica A2. Nas plantas endogâmicas A2, a fertilidade é restaurada pela expressão da região codificante do MS45 operacionalmente ligada ao promotor do BS7. As plantas endogâmicas A2 também contêm um constructo expressando o 5126HP. Essas plantas podem ser auto-fecundadas e a linhagem A2, homozigota para os insertos de transgene, é mantida independentemente das plantas endogâmicas A1.

Em algumas concretizações compreendidas neste exemplo, promotores de arroz (Oryza sativa) ortólogos dos genes 5126, BS7, e/ou MS45 de milho são utilizados. Ver tabela 1 para exemplos. Se nenhuma espécie está endicada, é assumido milho.

Tabela 1

	Planta A1(ms45ms45)	Planta A2(ms45ms45)
Construto de restauração	arroz5126::MS45	arrozBS7::MS45
Construto hairpin	UBI::arrozBS7pIR	UBI::arroz5126pIR
OU		
Construto de restauração	arroz5126::MS45	arrozMS45::MS45
Construto hairpin	UBI::arrozMS45pIR	UBI::arroz5126pIR

Para gerar semente para endogâmicas femininas para a produção de híbridos, a endogâmica A1 (contendo insertos de transgenes homozigotos) é submetida ao processo de despendoamento e fertilizada com pólen da endogâmica A2 (contendo insertos de transgenes homozigotos). A semente resultante desse cruzamento é plantada e todas as plantas da progênie são estéreis masculinas devido à presença dos alelos homozigotos ms45 e dos pIRs, que suprimem o construto MS45 correspontente (por exemplo, arrozMS45pIR suprime arrozMS45::MS45, e o arroz5126pIR suprime arroz5126::MS45). Ver Figura 2. Essas plantas são usadas como fêmeas na produção de híbrido e polinizadas com plantas homozigotas para o gene MS45 do tipo selvagem, resultando na semente híbrida F1. Todas as plantas derivadas desta semente são heterozigotas com relação ao gene MS45 e são, portanto, férteis masculinas.

Este exemplo demonstra que plantas contendo ambos constructos de repressão e restauração dominantes podem ser mantidas e usadas em uma estratégia de produção de semente híbrida para gerar endogâmicas femininas estéreis e plantas híbridas férteis.

EXEMPLO 6

UTILIDADE DE PLANTAS CONTENDO RNAs *HAIRPIN* ESPECÍFICOS DE PROMOTOR PARA REPRIMIR PROMOTORES PÓLEN-ESPECÍFICOS ALVO E CONSTRUCTOS DE COMPLEMENTAÇÃO MS45 PARA PRODUÇÃO DE HÍBRIDO E MANUTENÇÃO DE ENDOGÂMICAS

Este exemplo demonstra como um método compreendendo o uso de dois constructos, um constructo RNA *hairpin* (hpRNA) dominante específico para um promotor pólen-específico e um transgene de restauração, permite a propagação de uma planta tendo um caractere de reprodução recessivo homozigoto sem a perda da condição recessiva homozigota na progênie resultante, para uso na produção de plantas estéreis para a produção de híbridos. Isto é realizado pela introdução em uma planta de pelo menos um constructo de transgene de restauração, operacionalmente ligado a uma primeira seqüência de nucleotídeos compreendendo uma cópia funcional de um gene que complementa o caractere fenotípico mutante produzido pela condição recessiva homozigota com uma segunda seqüência de nucleotídeos funcional que interfere com a formação, função ou dispersão dos gametas masculinos da planta. Este constructo é mantido no estado hemizigoto e uma planta contendo um tal constructo é

referida como uma mantenedora. A interferência com a formação, função ou dispersão do gameta masculino pode ser realizada pela união das seqüências que interferem com a formação, função ou dispersão do gameta masculino com um promotor tecido-de-gameta-preferido. Na medida que o transgene está no estado hemizigótico, somente metade dos grãos de pólen produzidos contêm o constructo de transgene de restauração e nenhum desses é viável devido à ação do segundo gene ligado que evita a formação de pólen viável. Portanto, quando a planta mantenedora contendo um tal constructo ligado é usada como uma doadora de pólen para fertilizar a planta recessiva homozigota, os únicos gametas masculinos viáveis providos para a planta recessiva homozigota são aqueles que contêm o alelo recessivo, mas não contêm nenhum componente do constructo do transgene. A progênie resultante de um tal cruzamento sexual é não-transgênica com relação a este constructo de transgene.

Apesar de o pólen viável produzido pela mantenedora conter o constructo de transgene de restauração, 50% dos óvulos (o gameta feminino) conterão o constructo de transgene de restauração. Portanto, a mantenedora pode ser propagada por auto-fertilização, com o constructo de transgene de restauração segregando de modo tal que ele estará contido em 50% das sementes de uma mantenedora auto-fertilizada. Pela união do constructo de transgene de restauração com um marcador selecionável, os 50% de sementes contendo o transgene podem ser isolados para propagar a população mantenedora, a qual permanece

homozigota com relação ao gene recessivo e hemizigota com relação ao constructo de transgene de restauração. Neste cenário, uma única endogâmica pode ser mantida.

A endogâmica A1 é recessiva homozigota com relação ao gene de fertilidade ms45. As plantas endogâmicas A1 contêm um constructo no qual a fertilidade masculina é restaurada pela expressão da região codificante do MS45 usando um promotor tecido-específico, por exemplo, o promotor MS45 nativo. As plantas endogâmicas A1 também contêm um constructo *hairpin* que é alvo para reprimir um promotor de pólen expressado, neste exemplo, um constructo expressando o PG47HP operacionalmente ligado ao constructo de restauração do MS45, e um marcador selecionável ou passível de *screening*, por exemplo, um marcador que confere resistência a herbicida e/ou um constructo que serve como um marcador visual ou detectável para o *screening* de uma planta e/ou semente. Essas plantas são férteis e podem ser auto-fecundadas e mantidas. A semente nessas plantas segregará 50:50 com relação ao transgene porque somente o pólen não-transgênico é viável e capaz de efetuar a fertilização de um óvulo, 50% dos quais contêm o constructo.

Para gerar a semente para as endogâmicas femininas para a produção de híbrido, em uma fileira, somente as plantas não-transgênicas oriundas da endogâmica A1 são mantidas, essas plantas são recessivas homozigotas ms45 e

estéreis masculinas. Na fileira adjacente, ambas as plantas transgênica e não-transgênica oriundas da endogâmica A1 serão crescidas. A fertilidade nesta fileira segrega um a um (fértil para estéril); as plantas férteis são usadas para polinizar as plantas estéreis na fileira adjacente. A semente deste cruzamento é não-transgênica com relação ao restaurador operacionalmente ligado, o hpRNA e os constructos de marcador passível de *screening*, e todos da progênie são estéreis masculinos devido à presença do alelo ms45 homozigoto. Essas plantas são usadas como fêmeas em produção de híbrido e polinizadas com plantas homozigotas para o gene MS45 do tipo selvagem resultando em semente híbrida F1. Todas as plantas derivadas desta semente serão homozigotas com relação ao gene MS45 e, portanto, férteis masculinas.

Este exemplo demonstra que plantas contendo um constructo de *hairpin* de repressão de pólen dominante e um constructo de restauração de fertilidade podem ser mantidas como endogâmicas e usadas em uma estratégia de produção de semente híbrida para gerar endogâmicas estéreis femininas e plantas híbridas férteis.

EXEMPLO 7

COMBINAÇÕES

Dois ou mais componentes de constructo aqui descritos podem ser combinados de várias maneiras para criar sistemas para controlar a expressão de gene. Tais combinações podem ser feitas pela união de ditos componentes dentro de um único vetor, pelo uso de vetores múltiplos em transformações simultâneas ou seqüenciais, e/ou pelo melhoramento de plantas compreendendo um ou mais componentes. Os componentes possíveis estão descritos a seguir na Tabela 2. A Tabela 3 provê representações de combinações ilustrativas, que não são exaustivas, utilizáveis no controle da fertilidade masculina.

Por exemplo, os componentes podem incluir promotores ou regiões codificantes diferentes daquelas listadas, e a ordem dos componentes dentro dos constructos pode ser diferente daquela mostrada. Adicionalmente, um constructo pode compreender combinações individuais promotor/seqüência codificante, ou um promotor que dirige a transcrição de múltiplos componentes de seqüência codificante. Como um exemplo dos últimos, um constructo pode compreender um promotor constitutivo que dirige a transcrição de uma seqüência codificante de MS45, assim como um polinucleotídeo codificante de um produto de gene envolvido na produção ou regulação de um marcador passível de *screening* (por exemplo, pigmento) para criar um produto de fusão. Isto permitiria o *screening* de transformantes usando qualquer tecido da planta, enquanto a expressão da sequência codificante de MS45 resulta em fertilidade masculina.

Dentro de qualquer um dos constructos, podem estar incluídos componentes *hairpin* de um ou mais promotores, por exemplo, dentro de um intron de qualquer um dos genes codificados, ou dentro de uma região não-codificante 5´ ou 3´, ou como uma extensão do início ou do término. Um *hairpin* pode ter como alvo um único promotor, ou dois ou mais promotores dentro de um único RNA transcrito. As configurações *hairpin* pólen-promotor, e/ou polinucleotídeos codificantes de polipeptídeos pólen-rompentes, podem servir para evitar a transmissão de transgene através dos gametas masculinos.

Os promotores pólen-preferidos ou pólen-específicos ("Poll-P") incluem, por exemplo, PG47, P95 (o princípio entre os estágios meio- e tardio-uninucleado; ver SEQ ID NO: 2), e P67 (perfil semelhante a P95, mais altamente expressado no estágio meio-uninucleado; ver SEQ ID NO: 1).

Os promotores *tapetum*-específicos ("Tisp-P") ou *tapetum*-preferidos ("Tap-P") incluem, por exemplo, o MS45 (patente número US 6.037.523); o 5126 (patente número US 5.837.851); o Bs7 (documento WO 02/063021); e o SB200 (documento WO 02/26789).

Outros promotores tecido-específicos ou tecido-preferidos utilizáveis na invenção incluem, por exemplo, o

Br2 (Science 302(5642):71-2, 2003), o CesA8, e o LTP2 (Plant J 6:849-860, 1994).

Os promotores constitutivos ("ConstP") incluem, por exemplo, o promotor CaMV 35S (documentos WO 91/04036 e WO 84/02913); e o promotor de ubiquitina de milho.

Os genes de fertilidade masculina ("MF") utilizáveis na invenção incluem, por exemplo, o MS45 (Cigan et al., (2001) Sex. Plant Repro. 14:135-142; patente número US 5.478.369) e o MS26 (publicaçaõ de patente US 20030182689, concedida em 19 de dezembro de 2006 como patente número US 7.151.205).

Os genes de ablação de pólen ("*Cytotox*") utilizáveis na invenção incluem DAM (GenBank J01600, Nucleic Acids Res. 11:837-851 (1983); alfa-amilase (GenBank L25805, Plant Physiol. 105(2):759-760 (1994)); D8 (Physiol. Plant. 100(3):550-560 (1997)); SacB (Plant Physiol. 110(2):355-363 (1996)), lipases e ribonucleases. A esse respeito, é contemplado um único polipeptídeo, ou uma fusão de dois ou mais polipeptídeos para gerar um produto de fusão. Os sistemas de marcador selecionável utilizáveis na prática da invenção incluem, por exemplo, resistência a herbicida conferido por PAT ou MoPAT.

Os sistemas de marcador passíveis de *screening* utilizáveis na prática da invenção, por exemplo, na identificação de semente transgênica entre progênies de uma linhagem de mantenedora auto-fecundada, incluem GFP (Gerdes (1996) *FEBS Lett.* 389:44-47; Chalfie et al (1994) *Science* 263:802), RFP, DSred (Dietrich et al (2002) Biotechniques 2(2):286-293), KN1 (Smith et al (1995) Dev. Genetics 16(4):344-348), CRC, P, (Bruce et al (2000) Plant Cell 12(1):65-79, e Sugary1 (Rahman et al (1998) Plant Physiol. 117:425-435; James et al (1995) Plant Cell 7:417-429; U18908).

As configurações de *hairpin* podem compreender, por exemplo, PG47hp, P95hp, ou P67 hp. Um *hairpin* pode ter como alvo um único promotor ou pode ter como alvo dois ou mais promotores de um único RNA transcrito. O *hairpin* pode estar localizado em qualquer posição apropriada dentro do constructo, tal como dentro de um intron de qualquer um dos genes codificados ou dentro das regiões 5´ ou 3´ não-codificantes.

TABELA 2

Símbolo	**Descrição**	**Exemplo**
Poll-P	Promotor de Pólen	PG47, P95, P67
Tisp-P	Promotor Tecido-específico	Br2, CesA8, LTP2
Tap-P	Promotor de *Tapetum*	Ms45, 5126, Bs7, Sb200
ConstP	Promotor Constitutivo	35S, Ubi
MF	Gene de Fertilidade	Ms45, Ms26

Cytotox	Gene Citotóxico	DAM, Alpha-Amylase, D8, SacB
Herb R	Resistência a Herbicida	PAT, MoPAT
Screen	Marcador Passível de *Screening*	RFP, GFP, KN1, CRC, Su1
HP	Hairpin	PG47hp, P95hp, P67hp

TABELA 3

Descrição	**Componentes**
Citotóxico Simples + Seleção	Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Citotóxico Simples + Seleção + *Screening*	Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R/Tisp-P:Screen
Citotóxico duplo + Seleção	Poll-P:Cytotox/Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Citotóxico Simples + *Screening*	Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Screen
Citotóxico duplo + Screening	Poll-P:Cytotox/Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Screen
Hairpin + Citotóxico Simples + Seleção	ConstP:HP/Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Hairpin + Citotóxico Simples + *Screening*	ConstP:HP/Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Screen
Hairpin + Seleção	ConstP:HP/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Hairpin + *Screening*	ConstP:HP/Tap-P:MF/Tisp-P:Screen
Hairpin/fusão estéril masculina + *Screening*	ConstP:HP + MF/Tisp-P:Screen
Hairpin/fusão estéril masculina + Seleção	ConstP:HP + MF/ConstP:Herb R
Hairpin Embutido /Fértil masculino + Seleção	ConstP:MF Embedded HP/ConstP:Herb R
Hairpin Embutido /Fértil masculino + *Screening*	ConstP:MF Embedded HP/Tisp-P:Screen
Hairpin Embutido /*Screening*	Tap-P:MF/ConstP:Screen Embedded HP
Hairpin Embutido em Citotóxico	Poll-P:Cytotox/Tap-P:MF/ConstP:Screen Embedded HP

Simples/*Screening*	
Fertilidade Constitutivo/ *Screening* com *Hairpin* Embutido	ConstP:(MF + Screen) Embedded HP Tap-P:Cytotox/ConstP:(MF + Screen) Embedded HP

EXEMPLO 8

SELEÇÃO VISUAL MARCADOR-BASEADA

Os experimentos descritos a seguir foram projetados para questionar se o gene *p1* de milho, quando expressado a partir de vários promotores não-*p1*, podem ser usados como um marcador visual para semente portando um transgene ligado. Como parte do projeto experimental, a coloração de semente da planta transformada, assim como a coloração de semente gerada por meio de pólen de alogamia oriundo da planta transformada, foi testada para examinar a herança de expressão de gene materno e paterno *p1*.

O gene *p1* de milho é um ativador de transcrição Myb-relacionado que demonstrou regular os genes *a1* e *c2* para produzir 3-desoxi flavonóides, tais como C-glicosil flavonas, 3-desoxiantocianinas, flavan-4-óis e flobafenos (Grotewold et al., (1991) PNAS 88:4587-4591). A síntese desses e de compostos relacionados resulta na coloração de órgãos florais incluindo pericarpo, sabugo, estilo-estigmas, palha de milho e septorioses do pendão (Cocciolone et al., (2001) Plant J 27(5):467-478). Tipicamente, a expressão deste gene é maternal, quer dizer, a alogamia do gene *p1* não confere coloração para as partes reprodutoras até que a geração seguinte esteja crescida a

partir da semente. Como o gene *p1* mostrou conferir cor a tecidos de milho não-reprodutores por meio da expressão constitutiva em células de BMS (*Black Mexican Sweet* – Adoçante Negro Mexicano) (Grotewold et al., 1998 Pl Cell), a expressão do gene *p1* foi investigada pela colocação do gene *p1* sob o controle de transcrição dos promotores END2 e LTP2. A actina dos promotores constitutivos de arroz e a ubiquitina de milho também foram usados para regular o gene *p1*. Esses vetores devem testar se a expressão do gene *p1* conferiria diferenças de cor suficientes para uso como um marcador visual.

Os vetores a seguir foram introduzidos em milho por transformação com *Agrobacterium* e testados com relação à cor de semente para ambas a planta transformada e as espigas polinizadas com pólen oriundo de plantas transformadas.

23030	End2:P1-UbimoPAT
23066	Actin:P1-UBImoPat
23069	LTP2:P1-UBImoPat
23528	End2:P1-35SPAT
23535	LTP2:P1-35S:PAT
23537	UBI:P1-35S:PAT

A transformação com PHP23030 e PHP23069 produziu plantas apresentando sementes coloridas de segregação em ambas as espigas de plantas primárias transformadas e em

espigas polinizadas por meio de pólen dessas plantas transformadas. Para o PHP23030, 12 dos 14 eventos independentes usados para realizar a alogamia apresentaram grãos coloridos de marrom segregantes entre os grãos amarelos perto da relação de segregação 1:1. As espigas dos transformantes primários foram polinizados com pólen de plantas não transformadas e os grãos dessas espigas também segregaram em grãos marrom:amarelo perto de uma relação 1:1. Resultados idênticos foram observados com três dos quatro eventos gerados com o PHP23069.

A semente marrom e amarela de 5 eventos PHP23030 de cópia-única foram escolhidos e plantados para testar a germinação da semente marrom e a co-segregação do marcador de resistência a herbicida ligado, 35SPAT, com os grãos coloridos. Neste pequeno teste, a maioria (>95%) das sementes marrons produziu plantas resistentes a herbicida, enquanto que 39 das 40 mudas germinadas a partir de semente amarela ficaram sensíveis a herbicida.

Um exame cuidadoso das sementes marrons oriundas do PHP23030 revelou que a camada de aleurona fluoresceu verde, enquanto que o endosperma da semente marrom do PHP23069 mostrou fluorescência verde forte quando comparado com a semente segregante amarela derivada da mesma espiga. Isto é consistente com a observação da fluorescência verde observada em células de BMS bombardeadas com 35S:P1 (Grotewold et al., (1998) Plant Cell 10(5):721-740). Além

disso, o exame do calo transformado com PHP23528 (End2:P1-35SPAT) e PHP23535 (LTP2:P1-35S:PAT) revelou, em contraste com o calo GS3 não-transformado, calo verde fluorescido contendo ambos PHP23528 e PHP23535. A observação de fluorescência verde nesse calo transformado e a co-segregação dos grãos marrons com o marcador selecionável por herbicida em plantas transformadas indica que a expressão de *p1* a partir de promotores pelo menos semente-preferidos pode ser usada como um marcador visual para identificar tecidos transformados de milho.

EXEMPLO 9

ALTERNATIVAS PARA A CITOTOXICIDADE DE PÓLEN

Como mostrado nas Tabelas 2 e 3, a ruptura da função do pólen pode ser realizada por meio de qualquer um dentre numerosos métodos, incluindo a degradação de amido como alvo em grão de pólen ou interferência com acumulação de amido em pólen em desenvolvimento. Por exemplo, um constructo compreendendo a região codificante de alfa-amilase está operacionalmente ligada a um promotor específico de pólen. A região do peptídeo sinal de secreção nativa pode estar presente, pode ser removida ou pode ser substituída por um peptídeo sinal tendo como alvo amiloplastídeo. Em outras concretizações, um constructo pode compreender um promotor pólen-específico operacionalmente ligado a uma região codificante de beta-amilase; ou uma enzima des-ramificante tal como a *Sugary1* (Rahman et al (1998) Plant Physiol. 117:425-435; James et

al (1995) Plant Cell 7:417-429; U18908) ou pululanase (Dinges et al (2003) Plant Cell 15(3):666-680; Wu et al (2002) Archives Biochem. Biophys. 406(1):21-32).

EXEMPLO 10

SUBSTITUIÇÃO DE PROMOTORES ORTÓLOGOS

Promotores ortólogos de arroz e Arabidopsis (ver Figura 1)foram isolados e testados para (1) sua habilidade para regular a transcrição do gene restaurador MS45 de milho, conforme descrito no exemplo 2, e (2) o efeito de um pIR ortólogo-baseado na expressão de genes endógenos, e (3) se um pIR para um promotor ortólogo poderia efetivamente silenciar o transgene MS45 operacionalmente ligado ao dito promotor ortólogo.

As sequências de DNA isoladas de arroz e Arabidopsis foram modificadas por PCR para acomodar a construção da complementação do MS45 e vetores de repetição invertida. Tipicamente, os sítios de restrição HindIII e Ncol foram introduzidos nas extremidades 3' e 5', respectivamente, para os vetores de complementação. Para os vetores de repetição invertida, extremidades Notl-Ncol e HindIII-EcoRI foram geradas por PCR e subclonadas em vetores de expressão conforme descrito em Cigan et al, (2005) *Plant Journal 43*, 929-940.

(1) Habilidade para direcionar o gene restaurador MS45 de milho

Cassetes de expressão foram construídos, cada um compreendendo um promotor MS45, 5126, BS7, ou MS26 de milho, MS45, 5126, ou BS7 de Arabidopsis, operacionalmente ligado à região codificante MS45 de milho. Células de milho ms45ms45 homozigotas recessivas foram transformadas e plantas foram regeneradas, de acordo com os métodos conhecidos àqueles versados na técnica. Tipicamente, plantas individuais de 6 a 10 transformantes T0 de cópia única foram avaliadas para fertilidade masculina. Em cada caso, um alta freqüência (>90%) de plantas de insertos de TDNA independentes demonstraram restauração da fertilidade pelo promotor ortólogo direcionando o MS45. Além disso, restauração da fertilidade foi mantida quando plantas desse evento fértil foram analisadas em geração subseqüentes (T1, 3 plantas por evento e T3, 3 a 5 plantas por evento).

(2) Efeito de um pIR ortólogo-baseado na expressão de genes endógenos

Construtos foram criados compreendendo o pormotor de Ubiquitina operacionalmente ligado a um pIR baseado em cada um dentre os promotores MS45, 5126, e BS7 de arroz, e 5126 e BS7 de Arabidopsis. Células de milho selvagens foram transformadas e plantas foram regeneradas. Tipicamente, plantas individuais de 6 a 10 transformantes T0 de cópia

única foram avaliadas para efeitos em desenvolvimento da planta ou fertilidade masculina. Em cada caso, as plantas se desenvolveram normalmente e os efeitos na fertilidade não foram observados, indicando que o pIR ortólogo não afetou a expressão do gene endógeno alvo.

(3) Efeito de um pIR ortólogo-baseado na expressão do dito promotor ortólogo direcionado a MS45

Plantas masculinas férteis, ms45 homozigóticas recessivas contendo construtos descritos em (1) acima foram utilizadas para fertilizar plantas masculinas férteis Ms45/ms45 heterozigótias contendo o promotor pIR correspondente descrito em (2) acima. Plantas ms45-recessivas da progênie contendo ambos o promotor ortólogo operacionalmente ligado a MS45, e o pIR correspondente, foram avaliadas para fertilidade masculina. Cada pIR silenciou a expressão do seu promotor correspondente direcionado a MS45 e resultou em plantas masculinas estéreis devido a natureza recessiva do ms45 e a inabilidade do promotor operacionalmente ligado à cópia transgênica do MS45 de direcionar a transcrição deste gene; por exemplo, um pIR para arrozMS45 silenciou arrozMS45::MS45. Resultados similares foram obtidos utilizando os promotores 5126 de arroz e 5126 e BS7 de Arabidopsis. Ver Figura 3.

EXEMPLO 11

TESTE DE ALELO E UTILIZAÇÃO

Este exemplo fornece um método para avaliar a funcionalidade de variantes alélicos de um gene de interesse. Utilizando um pIR apropriado, o gene endógeno de interesse é suprimido. Um variante alélico do gene de interesse é expresso sob o controle de um promotor não-direcionado. Os elementos de complementação e supressão podem ser combinados em um único vetor. Ver Figura 4. Em uma concretização do método, o variante alélico é produzido por embaralhamento de gene. Estratégias para o embaralhamento de DNA são conhecidas na arte. Ver, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri, et al., (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore, et al., (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang, et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Crameri, et al., (1998) *Nature* 391:288-291; e Patentes números US 5,605,793 e 5,837,458.

Em concretizações adicionais, uma célula de planta é transformada com um cassete de expressão compreendendo um variante alélico selecionado operacionalmente ligado a um promotor apropriado, e uma planta transformada é regenerada. A planta regenerada pode apresentar uma mudança fenotípica. Em certas concretizações, a mudança fenotípica é mensurável somente quando a planta ou célula

que compreende o variante alélico ou seu produto gênico compreende também um segundo gene ou produto gênico, como uma molécula repórter ou cofator.

A Figura 5 representa uma concretização do método como aplicado ao gene de fertilidade masculina MS45; no entanto, os métodos da invenção podem ser empregados com respeito a um gene de interesse selecionado de uma vasta gama de genes que codificam um peptídeo envolvido em uma via metabólica que afeta uma variedade de características fenotípicas, incluindo aqueles listadas em outros trechos deste.

Em concretizações adicionais, os métodos deste exemplo são utilizados combinados com outros métodos descritos neste. Por exemplo, o silenciamento de um gene endógeno e a transformação com um variante alélico selecionado poderiam ser combinados com um método descrito no Exemplo 5, de forma que o variante alélico selecionado seja operacionalmente ligado a um promotor em uma primeira planta, e uma segunda planta compreenda um pIR direcionado ao dito promotor, de forma que a expressão do variante alélico selecionado possa ser controlada através de cruzamento.

EXEMPLO 12

MANUTENÇÃO DE RECESSIVOS LETAIS

Em uma concretização adicional dos métodos de complementação incorporando pIRs, um promotor ortólogo é empregado para complementara expressão de um mutante. Desta forma, plantas compreendendo construtos de transgenes correspondentes (como mostrado na Figura 6) resultamo em silenciamento do promotor complementar, desta forma expondo a planta à mutação recessiva.

Métodos utilizados neste, como para a construção de cassetes de expressão, transformação, regeneração de plantas, isolamento e análise de ácidos nucléicos, e pontuação de fertilidade masculina, são conhecidos àqueles de habilidade na arte; ver, por exemplo, Cigan et al, (2005) *Plant J.* 43:929-940, e as referências citadas nele, incluindo Cigan et al, (2001) *Sex. Plant Repro.* 14:135-142; e Unger et al, (2001) *Transgenic Res.* 10:409-422.

Apesar de a invenção ter sido descrita com referência ao exemplo acima mencionado, deve ficar entendido que modificações e variações estão englobadas dentro do espírito e escopo da invenção. Conseqüentemente, a invenção fica limitada somente pelas reivindicações.

Todas as publicações e patentes aqui referenciadas estão, assim, incorporadas a título de referência na mesma extensão como se cada uma delas fosse individualmente assim incorporada.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar a expressão de um variante alélico de um gene de interesse em uma planta ou célula de planta, caracterizado por compreender

(a) silenciar dito gene de interesse utilizando um construto pIR direcionado ao promotor que aciona a expressão do dito gene de interesse; e

(b) expressar dito variante alélico operacionalmente ligado a um segundo promotor.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a planta de acordo com a reivindicação 1 como uma primeira planta e compreender ainda um passo (c), onde uma segunda planta é cruzada com dita primeira planta, e onde dita segunda planta compreende um construto pIR direcionado ao segundo promotor.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo dito gene de interesse ser um gene endógeno.

4. Par de plantas caracterizado pela primeira planta compreender:

(a) um primeiro promotor operacionalmente ligado a um gene de interesse;

(b) um construto pIR direcionado ao dito primeiro promotor;

(c) um construto compreendendo um segundo promotor operacionalmente ligado a um variante alélico do gene de interesse; e

pela segunda planta compreender um construto pIR direcionado ao segundo promotor.

5. Método para controlar a expressão de uma mutação em uma primeira planta, caracterizado por compreender:

(a) transformar dita primeira planta com um construto compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo, onde a expressão do dito polinucleotídeo complementará a mutação;

(b) fornecer uma segunda planta compreendendo um construto pIR direcionado ao dito promotor da parte (a); e

(c) opcionalmente, cruzar as ditas primeira e segunda plantas.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela mutação ser letal à planta.

7. Par de plantas caracterizado por compreender:

(a) uma primeira planta compreendendo

(i) uma mutação para um gene de interesse e

(ii) um construto compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo heterólogo, onde a expressão do dito polinucleotídeo complementará a mutação; e

(b) uma segunda planta compreendendo um construto pIR direcionado ao dito primeiro promotor da primeira planta.

8. Par de plantas parentais caracterizado por compreender quatro polinucleotídeos, onde:

(a) a primeira planta do dito par compreende:

(i) um primeiro polinucleotídeo que codifica um produto gênico e é ligado operacionalmente a um promotor A; e

(ii) um segundo polinucleotídeo que codifica um polinucleotídeo pIR direcionado a sequência de promotor B, onde o promotor B não está presente na dita primeira planta;

(b) a segunda planta do dito par compreende:

(iii) um terceiro polinucleotídeo que codifica um produto gênico e é operacionalmente ligado ao dito promotor B; e

(ii) um quarto polinucleotídeo que codifica um polinucleotídeo pIR direcionado ao dito promotor A, onde o promotor A não está presente na dita segunda planta.

9. Par de plantas parentais de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por um ou mais dos ditos quatro polinucleotídeos ser exógeno.

10. Par de plantas parentais de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelos produtos gênicos afetarem a mesma característica fenotípica.

11. Par de plantas parentais de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela dita característica ser fertilidade masculina.

12. Par de plantas parentais de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela dita característica ser fertilidade feminina.

13. Par de plantas parentais de acordo com a reivindicação 8, caracterizadas por:

(a) o dito primeiro polinucleotídeo ser selecionado do grupo consistindo de polinucleotídeos que codificam MS45 de milho, BS7 de milho, 5126 de milho, e os ortólogos correspondentes de Arabidopsis e arroz;

(b) dito segundo promotor ser selecionado do grupo consistindo dos promotores de MS45 de arroz, BS7 de arroz, 5126 de arroz, BS7 de Arabidopsis, 5126 de Arabidopsis, e MS45 de Arabidopsis;

(c) dito terceiro polinucleotídeo ser selecionado do grupo consistindo dos polinuclaotídeos que codificam MS45 de milho, BS7 de milho, 5126 de milho, e os ortólogos correspondentes de Arabidopsis e arroz;

(d) dito primeiro promotor ser selecionado do grupo consistindo dos promotores de MS45 de arroz, BS7 de arroz, 5126 de arroz, BS7 de Arabidopsis, 5126 de Arabidopsis, e MS45 de Arabidopsis.

14. Método para gerar plantas desprovidas de um fenótipo particular a partir de plantas parentais que exibem este fenótipo caracterizado por compreender cruzar o par de plantas parentais de acordo com a reivindicação 10.

15. Célula caracterizada por ser da planta de acordo com a reivindicação 8.

16. Semente ou progênie caracterizada por ser da planta de acordo com a reivindicação 8.

17. Método para expressar seletivamente um primeiro polinucleotídeo de interesse na progênie de uma planta, caracterizado por compreender:

(a) transformar a dita planta com um primeiro construto compreendendo o dito polinucleotídeo operacionalmente ligado a um primeiro promotor exógeno;

(b) transformar a segunda planta com um construto pIR direcionado ao dito primeiro promotor;

(c) cruzar as ditas primeira e segunda plantas;

(d) selecionar a progênie compreendendo ditos primeiro e segundo construtos, onde a expressão não é desejada; e

(e) selecionar a progênie compreendendo o dito primeiro construto mas não o dito segundo construto, onde a expressão é desejada.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por dito segundo construto compreender ou ser co-transformado com um gene de marcador de seleção.

19. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pela primeira planta compreender ainda um terceiro construto compreendendo um pIR direcionado a um segundo promotor exógeno, e dita segunda planta compreender ainda um quarto construto compreendendo um segundo polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao dito segundo promotor exógeno.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelos ditos primeiro e segundo polinucleotídeos de interesse afetarem a mesma característica fenotípica.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pela dita característica ser fertilidade masculina.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pela dita característica ser fertilidade feminina.

23. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelos ditos primeiro e segundo polinucleotídeos codificarem o mesmo produto gênico.

24. Planta masculina estéril caracterizada por ser produzida pelo método de acordo com a reivindicação 21.

	NOME	FUNÇÃO	Adesão GENE	PROTEINA	Coordenadas	TAMANHO (NT)
		estrictosidina				
Milho	MS45	sintase	AF360356	AAK52489		
ARROZ			LOC_Os03g15710	NP_912416	Chr3:8645330-8645830(reverso complementado)TIGR	500
Arabidopsis			AT3G59530	NP_974462	Chr3:22004091 - 22004688 (TAIR versão 6.0)	597
Milho	MS26	citocromo P450	AF366297	AAK52956		
ARROZ			LOC_Os03g07250	XP_470289	Chr3:3680399-3681071(reverso complementado)TIGR	672
Arabidopsis			AT1G69500	NP_177109	Chr1: 26127176-26127762 (TAIR versão 6.0)	586
		chalcona e				
Milho	5126	estilbeno sintase	AX060770			
ARROZ			LOC_Os07g22850	NP_912707	Chr7:12882446-12883053(reverso complementado)TIGR	607
Arabidopsis			AT4G34850	NP_567971	Chr4: 16607608 - 16608354 TAIR v6.0 (11 Nov 2005)	746
		dihidroflavonol 4-				
Milho	BS7	redutase	AF366295	AAK52955		
ARROZ			LOC_Os08g40440	BAC78578	Chr8:	
Arabidopsis			AT4G35420	NP_195268	Chr4: 16835571 - 16836340 TAIR v6.0 (11 Nov 2005) (reverso complementado)	769

FIGURA 1

Informação fonte para os promotores ortólogos

FIGURA 2

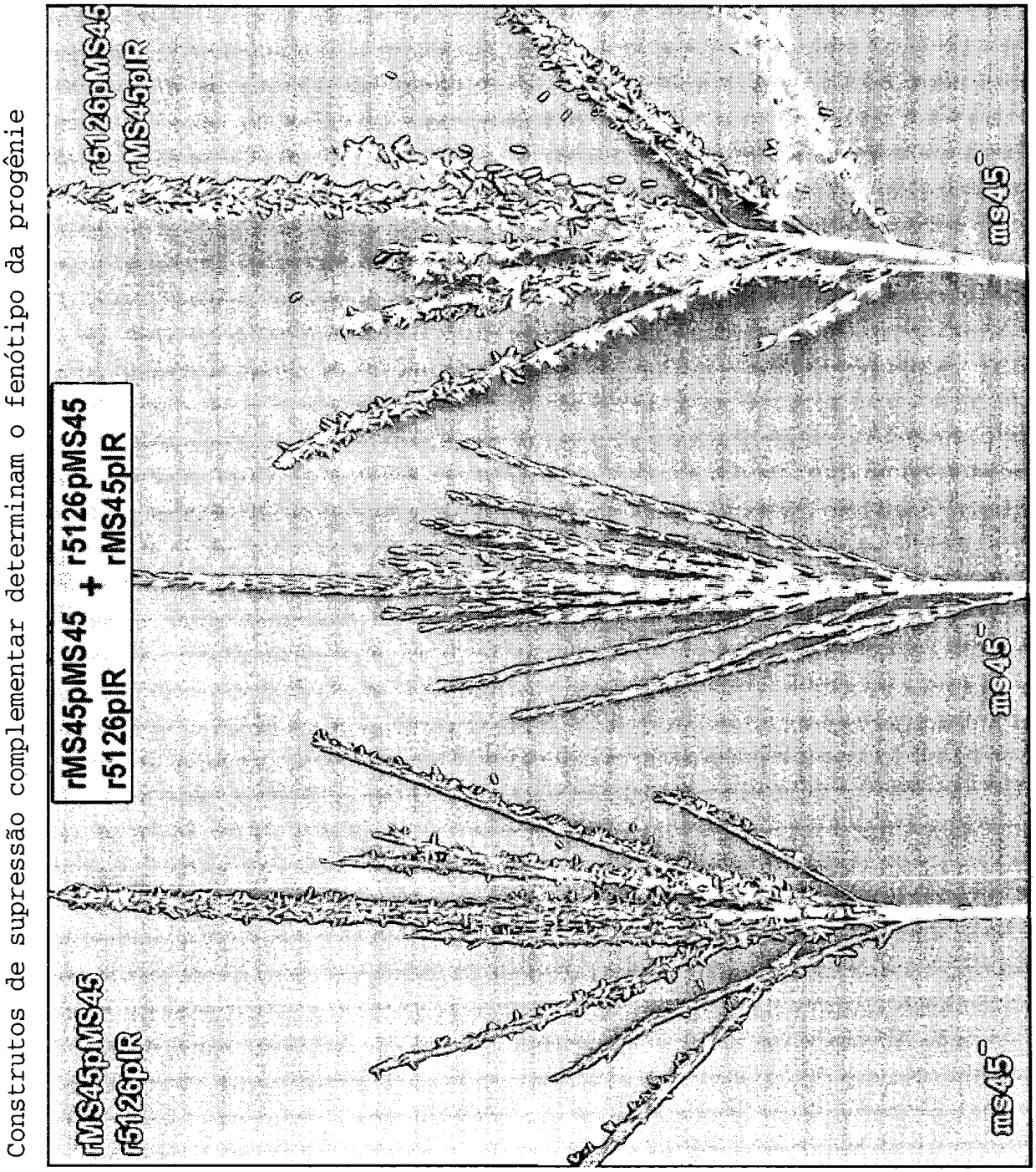

Construtos de supressão complementar determinam o fenótipo da progênie
rMS45pMS45
r5126pIR
rMS45pMS45 + r5126pMS45
r5126pIR rMS45pIR
r5126pMS45
rMS45pIR
ms45-
ms45-
ms45-

FIGURA 3

MS45 de arroz não suprime MS45 endógeno de milho mas suprime o MS45 transformado operacionalmente ligado ao promotor de arroz

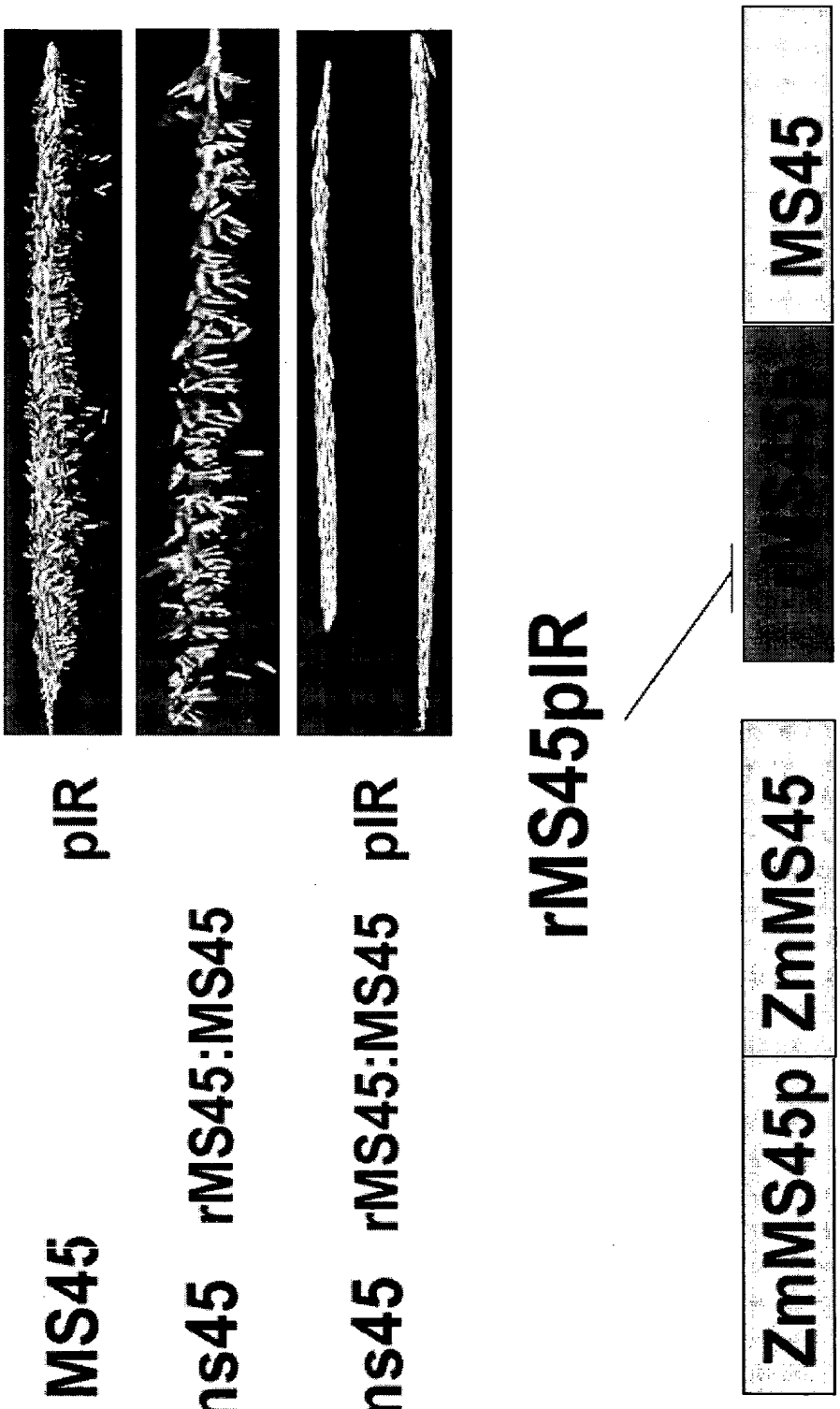


FIGURA 4

Desenho de vetor TDNA de complementação/supressão genérico

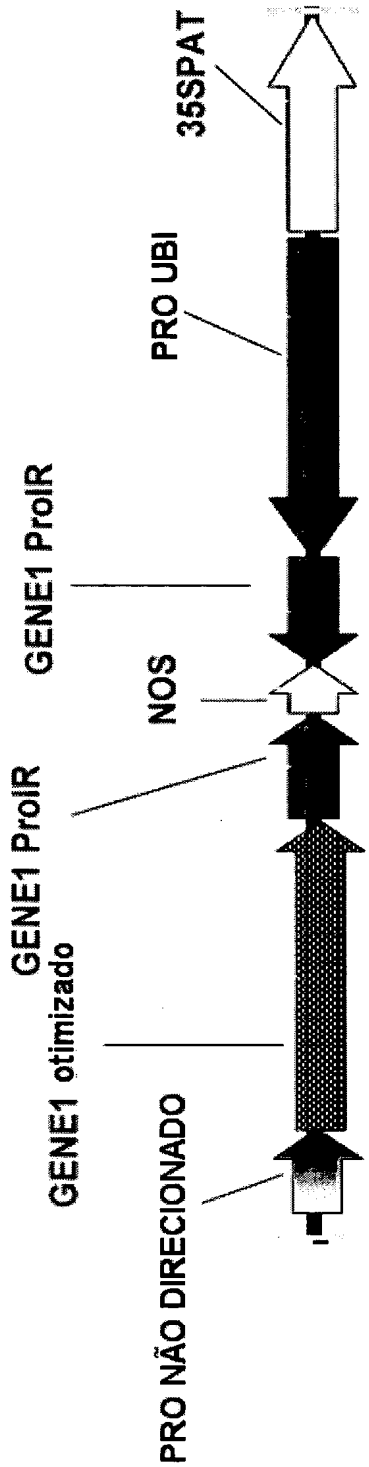
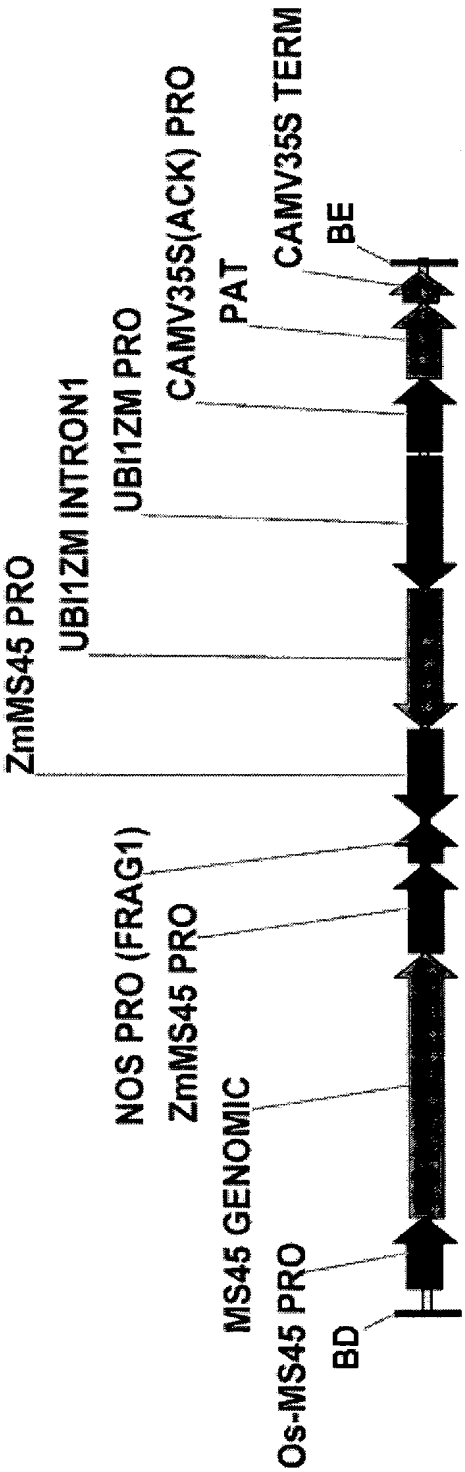
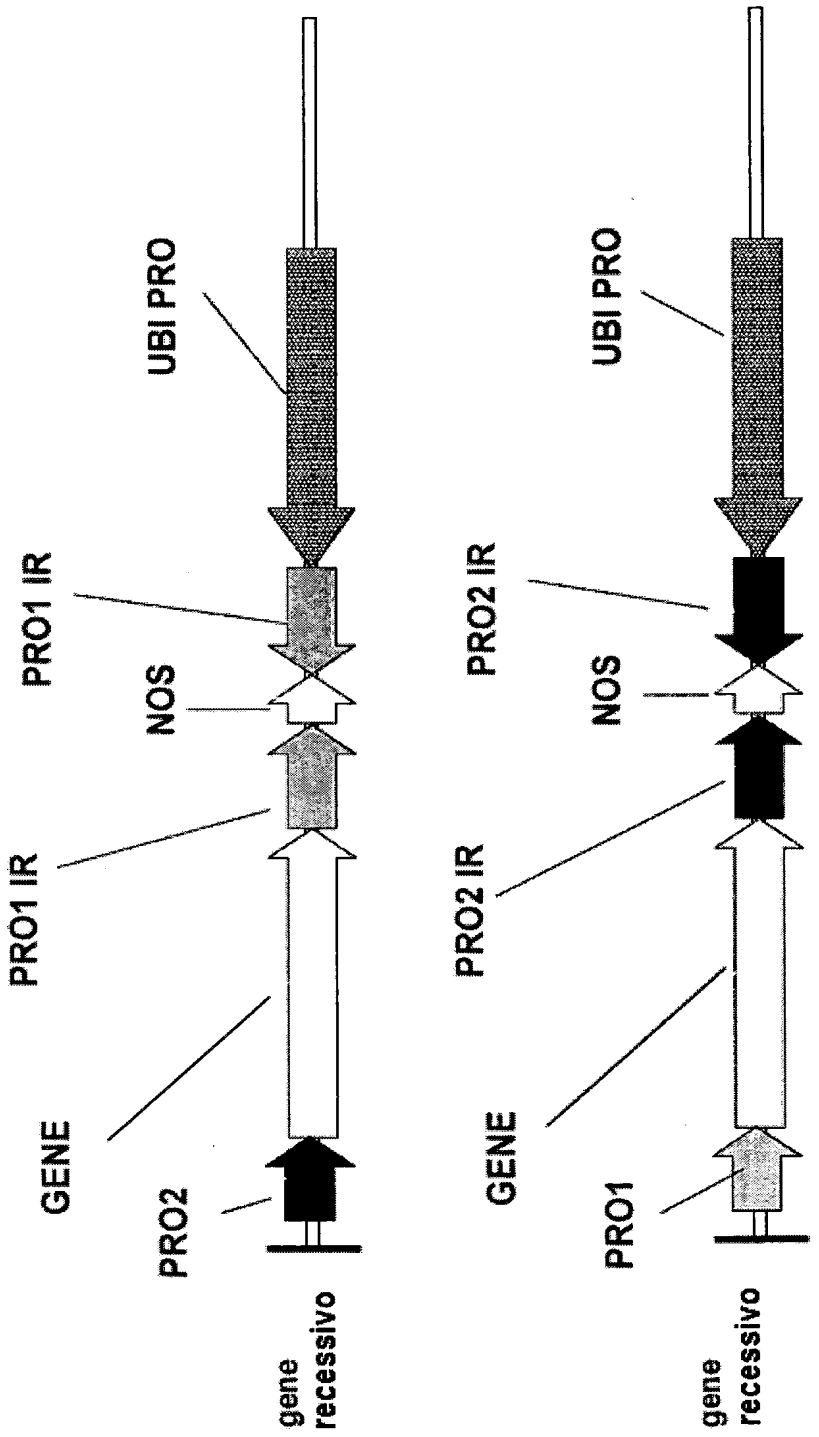


FIGURA 5



Desenho de vetor TDNA de complementação/supressão de MS45

FIGURA 6



Manutenção de recessivos letais utilizando um desenho de vetor TDNA de complementação/supressão

RESUMO

MÉTODO PARA CONTROLAR A EXPRESSÃO DE UM VARIANTE ALÉLICO DE UM GENE DE INTERESSE EM UMA PLANTA OU CÉLULA DE PLANTA, MÉTODO PARA CONTROLAR A EXPRESSÃO DE UMA MUTAÇÃO EM UMA PRIMEIRA PLANTA, PARES DE PLANTAS, PAR DE PLANTAS PARENTAIS, MÉTODO PARA GERAR PLANTAS DESPROVIDAS DE UM FENÓTIPO PARTICULAR A PARTIR DE PLANTAS PARENTAIS QUE EXIBEM ESTE FENÓTIPO, CÉLULA, SEMENTE OU PROGENIE, MÉTODO PARA EXPRESSAR SELETIVAMENTE UM PRIMEIRO POLINUCLEOTÍDEO DE INTERESSE NA PROGÊNIE DE UMA PLANTA, PLANTA MASCULINA ESTÉRIL

A presente invenção refere-se a pares de plantas, nas quais constructos complementares resultam em uma supressão de um fenótipo parental na progênie. Métodos de geração e manutenção das referidas plantas, bem como métodos de uso das mesmas, são fornecidos, incluindo o uso de plantas parentais na produção de plantas estéreis para a produção de sementes híbridas. A invenção também provê elementos de regulação para a expressão preferencial em pólen de polinucleotídeos nestes ligados.A presente invenção refere-se ainda a métodos de identificação de função gênica, métodos para testar variantes alélicos e métodos de repressão da transmissão de transgenes.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Título: Transgenes de supressão de gene dominante e métodos utilizando os mesmos

<130> Referência do documento: 1554R-PCT

<150> No. do pedido de prioridade: 11/685.956
<151> Data de depósito do pedido de prioridade: 14.03.2007

<160> Quantidade de SEQ ID Nos.: 3

<170> Software: FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> SEQ ID No.: 1
<211> Comprimento: 1112
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Zea mays

<220> Características:
<221> Nome/chave: promotor
<222> Localização: (1)...(1112)
<223> Outras informações: P67

<400> Seqüência: 1
gacgcgactg ctgacaaccc tagctagaaa caccctgaac actagttagg ttttcctctg 60
ttatctgcgt tgtcgatgta gttttcttta tctcgagcac cgatgtgcat ctgtgatcgg 120
gagatcatgt ctctggaaac tgttgtcttc gagatcctgt attaggagaa ggaaaataag 180
gtttttgaga agcgtattca catgactact cacgttttcc ttgccatcga ccacgtcgtc 240
gaccctgcta gcttccacgt tgtcattcag tatgttcgat cgcatcatct gatctaatct 300
tataatgcag ttcatctgtt atggtagaag tgtgtcgcat tcttataatt agcatgttag 360
ggttacatgt taggtaacag acaccgagat tatctctgta caccattgtt gccttcattg 420
cctacgtcgt ctctcacagc cacaggtgtc tgaatcatga ccctcttttt aggagtagtc 480
tgtagagatg tgaggtaaag cagctttgca cgagaacgcc aatctcgcgt gtttccgagt 540
attttactgc tccatttgtg ggctacgcct gttgtttccg ccacggatgt cggctgctca 600
tcaccaaaaa tatgactact ttgaagttct ggtagcagag tgggcccaga cgccgttgct 660
tgattctggc tgggccaggc tacgtgaggc cttcttatta gatcatttcc gctgaaaggc 720
cgaaacgtga gagcctggca aacttttcta gaaaaaaaaa attcgcaaac aaaatttttt 780
ccgaacaaac gctacaccag tgaccgccgt ccgtcgtcgt tgcttggctc tccctttact 840
tcggctccaa cgccaatgca caaccgtccc tcttcgccat gtcccagttt tgacgctgcc 900
tgtagcgcag tataaaaaat cgtctcgatg ctcttgctcg gtactccaat tcacaccaaa 960
acatagagtg tcgacttttc tattggtgtg attgggggca ctaaatacct accacattgc 1020
actcagacta catatactgt gtttgtgtgt tgtaagccgt aagcgtgtgt gagcttgcgc 1080
aaattggaca tctaggccgt gcgtaccctg cg 1112

<210> SEQ ID No.: 2
<211> Comprimento: 1092
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Zea mays

<220> Características:
<221> Nome/chave: promotor
<222> Localização: (1)...(1092)
<223> Outras informações: P95

<400> Seqüência: 2
gcgacgtcga gatcacgaga ggctcgtacg gggacaacgc gctaggtctc ttagtcagat 60
cagttcaaat ctcttaattc ttgtcctcct tctcagtcca gttcttacat ctatctgtct 120

gatcccatta tttccaacac cacttgaacc aatctgctct gatgccccgt tcctgatgtt 180
gtcgtcgttg tcactttctc gacgtgcgtt gtcgtccgac cctgacccct tctcgatgcc 240
tcatctccga cagacgacga gtttagcaaa ccagcgagcg ttgattctct gccgaaaagg 300
ttgcctgacc ccgtctcctt cccgatggcc ctacacttcg agaagatcac cacttcgaga 360
agatcaccag atcaatatcc gaaaagatac acatagttta gattcagtca gcaaaaagct 420
aacattatgt ttgcttcttt tattcatata gttttcttag catgaaattt aaattctata 480
tagtactggt tttttacgag cttacttaat tttattaggg ctaatttggt aaccacattt 540
ttccacggaa tttcaatttt cctaaggaaa attagttaat tttcgcttgg gaaaatagaa 600
atttcatggg aaaatgcggt tcccaaacta gccttagcct tataggtttt ttttagccca 660
tgtgaattct cgtcaaaggg actcagtcca cttcacagca ggtgaggtgg tttttgaatg 720
cccaaataca gatctgttaa ttaattttca gagggtcagg acgcggtcgc ccgaacgggc 780
ggacgcgcga acaatccgcc cgcccgcgcg cgcgacctgc cacttcgggc catggccagc 840
acccagcatg cgtcgtccta aacgacgagc accgcccgtt ggcgctataa agccccgcct 900
cggcgtcccc ttgtcaattc gaagccttcc cggttacccc ttcggcctcc acctatcacc 960
acccgggacg tcttccaggg tctcctcgta gtagaatagc tctatctcac cgcaacaact 1020
cctcattaca tcctttagga gaggctgatc gattggtaga tacgtactcg ggtggagcag 1080
aacaacgaga ga 1092

<210> SEQ ID No.: 3
<211> Comprimento: 597
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Oryza sativa

<220> Características:
<221> Nome/chave: promotor
<222> Localização: (1)...(597)
<223> Outras informações: Região do promotor BS7 de Arroz

<400> Seqüência: 3
agcttgtttt tggttcaaac aaaagcagca gcagcagcaa agaaccagag aaggctcctc 60
ctgttaaagt tgatgaactt gcaaagaagg aagagcccaa gttccaagca ttttctggga 120
cgagctactc gttgaaacgt tagctgctgc tattagggtt aaaagttttg gaatcaatca 180
tttgtttctt acttggagtt cgcctggtta ctctggcagc tgtaaatgat tggtagcaat 240
gtgtatcttt atcattttca gttctccctt aataattcta gttattgtct tgctaattaa 300
aagaattccg tggattacat ggaacctgat actatttgct tgaccatatg tggagttttc 360
ttgcaatgtc aagcagaacg cattgctaat gtactcaacc aactccctac ctagagaaga 420
ttctaactga atctaccctc aaccaacctg cttctccatc agttaattat gatcacaaaa 480
atgaggtgat gtacaacatt tcttggtcct cctcctctag gatatttctt tgctgtgctt 540
atatgagcag gttgatttgc ttcagagttc aacatcatca cttccagttt gagaaac 597