



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

(21) BR 102014032935-8 A2



* B R 1 0 2 0 1 4 0 3 2 9 3 5 A

(22) Data do Depósito: 30/12/2014

(43) Data da Publicação: 06/10/2015
(RPI 2335)

(54) Título: PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; C12N 15/63; C12N 5/10; A01H 5/00; A01H 5/10

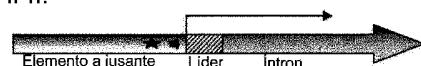
(30) Prioridade Unionista: 31/12/2013 US 61/922,526

(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC

(72) Inventor(es): SANDEEP KUMAR, MANJU GUPTA, TERRY R. WRIGHT, SUSAN M. JAYNE, DOUG A. SMITH, DIAA ALABED

(74) Procurador(es): DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA - API 192

(57) Resumo: PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO. A presente invenção refere-se ao promotor Zea mays c.v. B73 ubiquitina-1 (Z. mays cv B73 Ubi-1) que conduzem os níveis elevados de expressão constitutiva do transgene nas plantas. O uso repetido do mesmo promotor Z. mays c.v. B73 Ubi-1 nos constructos multigene podem também levar ao silenciamento de genes, tornando os produtos transgênicos menos eficazes. São proporcionados elementos promotores de regulamentação de genes, os constructos, e métodos para a expressão de um transgene em células de plantas e / ou tecidos de planta usando os elementos de regulamentação dos genes a partir do promotor Ubi-1 de um diferente genótipo Z. mays, Z. mays cv Hi-II.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PRO-MOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO".

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

[001] A presente invenção reivindica o benefício ao 35 USC § 119 (e), do Pedido de Patente Provisório US N ° de Série 61 / 922,526, depositado em 31 de dezembro de 2013, toda a descrição da qual é incorporada na presente invenção por meio de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se, de uma maneira geral, ao campo da biologia molecular de plantas, e , de uma forma mais específica, ao campo de expressão de transgenes em plantas.

ANTECEDENTES

[003] Muitas espécies de plantas são capazes de serem transformadas com os transgenes para introduzir agronomicamente traços ou características desejáveis. As espécies de plantas são desenvolvidas e / ou modificadas para ter características particulares desejáveis. Geralmente, as características desejáveis incluem, por exemplo, a melhoria da qualidade de valor nutricional, o aumento da produção, que confere resistência a doenças ou pragas, o aumento da seca e tolerância ao stress, a melhoria das qualidades hortícolas (por exemplo, de pigmentação e crescimento), conferindo resistência a herbicidas, permitindo a produção de compostos e / ou materiais industrialmente úteis a partir da planta, e / ou que permitam a produção de produtos farmacêuticos.

[004] As espécies de plantas transgênicas que compreende vários transgenes empilhados em um único local genômico são produzidas por meio de tecnologias de transformação de plantas. As tecnologias de transformação de plantas resultam na introdução de um transgene em uma célula de planta, a recuperação de uma planta transgê-

nica fértil que contém a cópia integrada de forma estável do transgene no genoma da planta, e subsequente a expressão do transgene através da transcrição e da tradução do genoma de plantas resulta em plantas transgênicas que possuem características e fenótipos desejáveis. No entanto, os mecanismos que permitem a produção de espécies de plantas transgênicas para altamente expressar múltiplos transgenes manipuladas como uma característica em traço são desejáveis.

[005] Da mesma forma, os mecanismos que permitem a expressão de um transgene dentro de determinados tecidos ou órgãos de uma planta são desejáveis. Por exemplo, o aumento da resistência de uma planta à infecção por meio dos agentes patogênicos nascidos no solo pode ser realizado por meio da transformação do genoma de uma planta com um gene de resistência ao patógeno de tal forma que a proteína de resistência ao agente patogênico é robustamente expressa dentro das raízes da planta. De uma forma alternativa, pode ser desejável expressar um transgene em tecidos de plantas que se encontram em um crescimento ou fase de desenvolvimento em particular, tais como, por exemplo, divisão celular ou alongamento.

[006] São descritos, na presente invenção, os elementos de regulamentação do promotor Ubi-1 Zea mays, incluindo os promotores, os promotores a montante- 5'-UTRs, e íntrons. Além disso, são descritos os constructos e os métodos que utilizam os elementos de regulação de genes.

SUMÁRIO

[007] São descritos na presente invenção, promotores, constructos e métodos para a expressão de um transgene em células de plantas e / ou tecidos de planta. Em uma modalidade, a expressão de um transgene compreende a utilização de um promotor. Em uma modalidade, um promotor compreende uma sequência de polinucleotídeo. Em uma modalidade, uma sequência de promotor polinucleotídeo

compreende um promotor a montante, uma região 5' não traduzida (5'-UTR) ou sequência líder, e um ítron. Em uma modalidade, uma sequência de promotor polinucleotídeo comprehende o gene Ubiquitina-1 (Ubi-1). Em uma modalidade, uma sequência de promotor polinucleotídeo comprehende o gene Ubi-1 de *Zea mays* (*Z. mays*).

[008] Em uma modalidade, um constructo inclui um cassete de expressão de genes que comprehende uma sequência de polinucleotídeo do promotor que foi obtido a partir do gene Ubi-1 de *Z. mays*. Em uma modalidade, a sequência de promotor polinucleotídeo Ubi-1 a partir de *Z. mays* comprehende uma região de promotor a montante, 5'-UTR ou sequências de comando, e por um ítron. Em uma modalidade, um constructo inclui um cassete de expressão de genes que comprehende uma sequência de polinucleotídeo do promotor obtido a partir do gene Ubi-1 de *Z. mays* fundido para um ítron do gene que codifica para proteína fluorescente amarela a partir das espécies *Phialidium* (PhiYFP). Em uma modalidade, um constructo inclui um cassete de expressão de genes que comprehende uma sequência de polinucleotídeo do promotor obtido a partir do gene Ubi-1 de *Z. mays* fundido para um ítron do gene que codifica para proteína fluorescente amarela a partir das espécies *Phialidium* (PhiYFP), seguido por uma região não traduzida 3' (3'-UTR) do gene 5 de peroxidase *Z. mays*. (*ZmPer5*). A sequência de polinucleotídeo resultante comprehende um elemento de regulação do gene promotor romance.

[009] Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene inclui um elemento de regulamentação do promotor do gene de uma forma operativa ligado a um transgene ou uma sequência de codificação heteróloga. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene inclui, pelo menos, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, ou mais transgenes.

[0010] Os métodos de crescimento das plantas que expressam um

transgene, usando os novos elementos de regulamentação do promotor de genes (por exemplo, um promotor a montante, 5'-UTR, e ítron) são descritos na presente invenção. Os métodos de cultura de tecidos de plantas e de células que expressam um transgene, usando o novo elemento de regulamentação do promotor do gene também são descritos na presente invenção. Em uma modalidade, os métodos como descritos na presente invenção incluem a expressão constitutiva do gene em folhas de plantas, raízes, caules, e pólen. Os métodos de purificação de uma sequência polinucleotídica que compreende o novo elemento de regulamentação do promotor do gene também são descritos na presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0011] A FIGURA 1 mostra um novo promotor esquemático que compreende o Gene Ubi-1Zea mays cv B73. O promotor é composto de um elemento a montante, 5'-UTR ou uma sequência líder, e um ítron. O elemento a montante está localizado 5' a montante da Local de Início da Transcrição (TSS), indicado pela seta longa. O elemento a montante é composto de elementos de regulamentação, tais como uma caixa TATA, indicada pela seta curta, e um elemento de choque térmico, indicado pela seta estrela.

[0012] A FIGURA 2 mostra o mapa do plasmídeo para o vetor pDAB105713 que compreende a sequência do promotor amplificado por PCR do Gene Ubi-1Z. mays cv Hi-II.

[0013] A FIGURA 3 mostra a sequência de polinucleotídeo do promotor de controle Z. mays cv B73 Ubi-1 (SEQ ID NO : 1) com a região a montante do promotor sublinhado, a 5'-UTR / sequência líder sombreada, e a região do ítron em letras minúsculas.

[0014] A FIGURA 4 mostra a sequência de polinucleotídeo do promotor de Z. mays cv Hi-II Ubi-1 (SEQ ID NO : 2) com a região a montante do promotor sublinhado, a 5'-UTR / sequência líder sombre-

ada, e a região do ítron em letras minúsculas.

[0015] A FIGURA 5 mostra o alinhamento da sequência polinucleotídica das regiões promotoras a montante de *Z. mays* cv Hi-II (SEQ ID NO : 4) em comparação com à sequência a montante do promotor de Controle *Z. mays* c.v. B73- (SEQ ID NO : 3).

[0016] A FIGURA 6 mostra o alinhamento da sequência polinucleotídica das regiões líder / 5'-UTR de *Z. mays* cv Hi-II (SEQ ID NO : 6) em comparação com a sequência líder / *Z. mays* c.v. B73 5'-UTR de Controle (SEQ ID NO : 5).

[0017] A FIGURA 7 mostra o alinhamento da sequência polinucleotídica das regiões de ítrons de *Z. mays* cv Hi-II (SEQ ID NO : 8) em comparação com a sequência de ítron *Z. mays* c.v. B73 de Controle (SEQ ID NO : 7).

[0018] A FIGURA 8 mostra um mapa do vetor do constructo de expressão binário, pDAB105748, que compreende o vetor de entrada de controle, pDAB105742 (*Z. mays* cv B73), inserido no vetor de destino, pDAB10197.

[0019] A FIGURA 9 mostra um mapa do vetor do constructo de expressão binário, pDAB105746, que compreende o vetor de entrada, pDAB105740 (*Z. mays* cv Hi-II), inserido no vetor de destino, pDAB10197.

DESCRÍÇÃO DETALHADA

Definições

[0020] Tal como usado na presente invenção, os artigos, "um", "uma", "a" e "o" incluem referências plurais a menos que o contexto dite claramente e sem ambiguidade de uma outra maneira.

[0021] Tal como usado na presente invenção, o termo "retrocruzamento" refere-se a um processo no qual um criador atravessa a descendência híbrida de volta para um dos pais, por exemplo, um híbrido de primeira geração F1 com um dos genótipos do híbrido F1.

[0022] Tal como usado na presente invenção, o termo "ítron" refere-se a qualquer sequência de ácido nucleico compreendida em um gene (ou sequência de nucleotídeos de interesse expressa) que é transcrita, mas não traduzida. Os ítrons incluem a sequência não traduzida de ácido nucleico dentro de uma sequência de DNA expressa, bem como uma sequência correspondente em moléculas de RNA transcritas dos mesmos.

[0023] Um constructo descrito na presente invenção pode também conter as sequências que intensificam a tradução e / ou estabilidade do mRNA, tais como ítrons. Um exemplo de um tal ítron é o primeiro ítron do gene II da variante de histona H3 de *Arabidopsis thaliana* ou de qualquer outra sequência de ítron comumente conhecida. Os ítrons podem ser usados em combinação com uma sequência de promotor para aumentar a tradução e / ou estabilidade do mRNA.

[0024] Tal como usado na presente invenção, os termos "região não traduzida 5' " ou "5'-UTR" refere-se a um segmento não traduzido no terminal 5' de pré-mRNA ou mRNA maduro. Por exemplo, no mRNA maduro, um 5'-UTR tipicamente abriga em sua extremidade 5' uma tampa 7-metilguanosina e está envolvido em muitos processos, tais como fatiamento, poliadenilação, mRNA exporta para o citoplasma, a identificação do terminal 5' do mRNA pela maquinaria de tradução, e proteção dos mRNAs contra a degradação.

[0025] Tal como usado na presente invenção, o termo "região não traduzida 3" ou "3'-UTR" refere-se a um segmento não traduzido em um terminal 3' do pré-mRNA ou mRNA maduro. Por exemplo, no MRNA maduro esta região abriga cauda poli- a (A) e é conhecida por ter muitos papéis na estabilidade do mRNA, a iniciação da tradução, e exportação de mRNA.

[0026] Tal como usado na presente invenção, o termo "sinal de poliadenilação" refere-se a uma sequência de ácido nucleico presente

em transcritos de mRNA que permite a transcrição, quando na presença de uma poli (A) polimerase, para ser poliadenilada sobre o local de poliadenilação, por exemplo, localizados 10 a 30 bases a jusante do poli- (A) sinal. Muitos sinais de poliadenilação são conhecidos na técnica e são úteis para a presente invenção. Uma sequência exemplar inclui AAUAAA e as variantes dos mesmos, como descrito em J. Loke et al, (2005) *Plant Physiology* 138 (3). ; 1457 a 1468.

[0027] Tal como usado na presente invenção, o termo "isolado" refere-se a um componente biológico (incluindo um ácido nucleico ou proteína) que foi separado de outros componentes biológicos na célula do organismo em que o componente ocorre naturalmente (isto é, DNA cromossômico ou extracromossômico).

[0028] Tal como usado na presente invenção, o termo "purificado", em referência a moléculas de ácido nucleico não requer uma pureza absoluta (tal como uma preparação homogênea). Em vez disso, "purificado" representa uma indicação de que a sequência é relativamente mais pura do que no seu ambiente celular nativo. Por exemplo, o nível de "purificado" de ácidos nucleicos deve ser pelo menos de 2 a 5 vezes maior, em termos de níveis de concentração ou de expressão do gene, em comparação com o seu nível natural.

[0029] As moléculas de DNA reivindicadas podem ser obtidas de uma maneira direta a partir de DNA total ou de RNA total. Além disso, os clones de cDNA não ocorrem naturalmente, mas são de preferência obtidos através da manipulação de uma substância de ocorrência natural , parcialmente purificada (RNA mensageiro). O constructo de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA envolve a criação de uma substância sintética (cDNA). Os clones de cDNA individuais podem ser purificados a partir da biblioteca sintética por meio da seleção clonal das células que transportam a biblioteca de cDNA. Dessa maneira , o processo que inclui o constructo de uma biblioteca de cDNA a partir de

mRNA e purificação de clones de CDNA distintos origina uma purificação de aproximadamente 106 vezes da mensagem nativa. Da mesma forma, uma sequência de DNA promotor pode ser clonada em um plasmídeo. Tal clone não é de ocorrência natural, mas sim é preferencialmente obtido através de manipulação de uma substância que ocorre naturalmente, parcialmente purificada, tal como uma biblioteca de DNA genômico. Dessa maneira, a purificação de pelo menos uma ordem de magnitude, de preferência duas ou três ordens, e mais preferencialmente quatro ou cinco ordens de magnitude, é favorecida nessas técnicas.

[0030] Da mesma forma, a purificação representa uma indicação de que uma alteração química ou funcional na sequência de DNA componente ocorreu. As moléculas de ácidos nucleicos e proteínas que tenham sido "purificadas" incluem as moléculas de ácidos nucleicos e de proteínas purificadas por meio dos métodos de purificação convencionais. O termo "purificado" também abrange os ácidos nucleicos e proteínas preparadas por meio dos métodos de DNA recombinantes em uma célula hospedeira (por exemplo, células de plantas), bem como moléculas de ácidos nucleicos quimicamente sintetizadas, proteínas e peptídeos.

[0031] O termo "recombinante" significa uma célula ou organismo em que tenha ocorrido a recombinação genética. Ele também inclui uma molécula (por exemplo, um vetor, plasmídeo, ácido nucleico, polipeptídeo, ou um pequeno RNA) que foi alterado artificialmente ou via sintética (isto é, não natural) por intervenção humana. A alteração pode ser realizada na molécula dentro de, ou retirada de seu ambiente ou estado natural.

[0032] Tal como usado na presente invenção, o termo "expressão" refere-se ao processo pelo qual um polinucleotídeo é transcrito em mRNA (incluindo as pequenas moléculas de RNA) e / ou o processo

pelo qual o mRNA transcrito (também referido como "transcrição") é subsequentemente traduzido em peptídeos, polipeptídeos, ou proteínas. A expressão dos genes pode ser influenciada por meio dos sinais externos, por exemplo, a exposição de uma célula, tecido, organismo ou a um agente que aumenta ou diminui a expressão do gene. A expressão de um gene pode também ser regulada em qualquer parte do percurso a partir de DNA para RNA para a proteína. A regulação da expressão do gene ocorre, por exemplo, através do controle que atua sobre a transcrição, a tradução, o transporte e o processamento de RNA, a degradação de moléculas intermediárias, tais como mRNA, ou através da ativação ou inativação, compartimentalização, ou degradação de moléculas proteicas específicas, depois de terem sido feitas, ou por meio das combinações dos mesmos. A expressão gênica pode ser medida ao nível do RNA ou o nível de proteína por meio de qualquer método conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, transferência de Northern, RT-PCR, Western blot, ou ensaio (s) de atividade da proteína in vitro, in situ ou in vivo,

[0033] Tal como usado na presente invenção, os termos "silenciamento de genes com base em homologia" ou "HBGS" são termos gênicos que incluem tanto o silenciamento do gene da transcrição quanto o silenciamento pós-transcricional de genes. O silenciamento de um local alvo por um local de silenciamento dissociado pode resultar da inibição de transcrição (por exemplo, o silenciamento transcripcional do gene; TGS) ou a degradação de mRNA (por exemplo, o silenciamento pós-transcricional ; PTGS), devido à produção de RNA de filamento duplo (DsNA) correspondente ao promotor ou sequências transcritas, respectivamente. O envolvimento de componentes celulares distintos em cada processo sugere que TGS e PTGS induzidos por dsRNA provavelmente resultam da diversificação de um antigo mecanismo comum. No entanto, uma comparação rigorosa de TGS e PTGS

tem sido difícil de conseguir, uma vez que geralmente se baseia na análise dos locais de silenciamento distinosa. Um único local do transgene pode ser descrito para desencadear tanto TGS quanto PTGS, devido à produção de DsNA correspondente ao promotor e sequências transcritas de genes alvo diferentes.

[0034] Tal como usado na presente invenção, os termos "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" (todos os três termos sendo sinônimos uns com os outros) referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos, o qual pode incluir tanto os códons sentido e antisentido de RNA, cDNA, DNA genômico, formas sintéticas e polímeros, e as misturas dos mesmos. Um "nucleotídeo" pode referir-se a um ribonucleotídeo, desoxirribonucleotídeo, ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. Uma molécula de ácido nucleico é normalmente pelo menos dez bases de comprimento, a menos que seja especificado de uma outra forma. Os termos podem referir-se a uma molécula de RNA ou DNA de comprimento indeterminado. Os termos incluem DNA de filamento simples e de filamento duplo. Uma molécula de ácido nucleico pode incluir um ou ambos os nucleotídeos que ocorrem naturalmente e modificados ligados entre si por meio das ligações nucleotídicas que ocorrem naturalmente e / ou que não ocorrem naturalmente.

[0035] As moléculas de ácido nucleico podem ser modificadas quimicamente ou bioquimicamente ou podem conter bases não naturais ou derivados de nucleotídeos, tal como será prontamente apreciado por meio daquelas pessoas que são videsadas na técnica. Tais modificações incluem, por exemplo, marcadores, metilação, substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, modificações de internucleotídeos (por exemplo, ligações sem carga, tais como, os fosfonatos de metila, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; ligações carregadas, tais como, fosforoti-

oatos, fosforoditioatos, etc . . ; porções pendentes, tais como, peptídeos ; intercaladores, tais como, acridina, psoraleno, etc . ; quelantes ; alquilantes ; e ligações modificadas, tais como, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). O termo "molécula de ácido nucleico" também inclui qualquer conformação topológica, incluindo filamento simples, filamento duplo, parcialmente duplex, triplex, em U, circular, e conformações parcialmente cadeadas.

[0036] A transcrição procede de 5' para 3' de um modo ao longo de um filamento de DNA. Isto significa que o RNA é feita por meio da adição sequencial de ribonucleotídeo-5'-trifosfatos para o terminal 3' do filamento em crescimento, com uma eliminação do requisito do pirofosfato. Em qualquer molécula de ácido nucleico circular ou linear, os elementos discretos (por exemplo, sequências de nucleotídeos específicas) podem ser referidos como sendo "a montante" em relação a um outro elemento, se eles estão ligados ou seriam ligados ao mesmo ácido nucleico na direção 5' daquele elemento. Da mesma forma, os elementos discretos podem ser referidos como sendo "a jusante" em relação a um outro elemento, se eles estão ou podem ser ligados ao mesmo ácido nucleico na direção 3' a partir desse elemento.

[0037] Tal como usado na presente invenção, o termo "posição de base" refere-se à localização de uma determinada base de resíduos de nucleotídeos ou dentro de um ácido nucleico designado. Um ácido nucleico designado pode ser definido por meio do alinhamento com um ácido nucleico de referência.

[0038] Tal como usado na presente invenção, o termo "hibridação" refere-se a um processo em que os oligonucleotídeos e os seus análogos hibridam por meio da ligação de hidrogênio, que inclui a ligação de hidrogênio Watson-Crick, de Hoogsteen ou de Hoogsteen invertida entre bases complementares. De um modo geral, as moléculas de ácidos nucleicos consistem em bases que são nitrogenadas ou de pirimi-

dinas, tais como a citosina (C), uracila (U), e timina (T), ou de purinas, tais como adenina (A) e guanina (G). As Bases nitrogenadas formam as ligações de hidrogênio entre uma pirimidina e uma purina, e a ligação de uma pirimidina de uma purina é referida como "emparelhamento de bases". Mais especificamente, A formará uma ligação de hidrogênio específica para T ou L, e L se ligará especificamente a C. "Complementar" refere-se ao emparelhamento de bases que ocorre entre duas sequências de ácidos nucleicos diferentes, ou duas regiões distintas da mesma sequência de ácido nucleico.

[0039] Tal como usado na presente invenção, os termos "hibrida especificamente" e "complementa especificamente" refere-se a um grau suficiente de complementaridade tal que estável e a ligação específica ocorre entre um oligonucleotídeo e um DNA ou RNA alvo. Os oligonucleotídeos precisam ser 100 % complementares para a sequência alvo para hibridar especificamente. Um oligonucleotídeo é especificamente hibridado quando a ligação do oligonucleotídeo com a molécula alvo de DNA ou de RNA interfere com a função normal do DNA ou RNA alvo, e não há grau suficiente de complementaridade para evitar a ligação não específica de um oligonucleotídeo para sequências não alvo em condições em que a ligação específica seja desejável, por exemplo, sob condições fisiológicas, no caso de ensaios ou sistemas *in vivo*. Esta ligação é referida como a hibridação específica. As condições de hibridação, resultando em graus específicos de rigor irão variar dependendo da natureza do método de hibridação escolhido e da composição e do comprimento das sequências de ácidos nucleicos que hibridam. Geralmente, a temperatura de hibridação e a força iônica (especialmente concentração Na^+ e / ou Mg^{2+}) de um tampão de hibridação que irá contribuir para o rigor da hibridação, embora os tempos de lavagem de restrição também influenciam. Os cálculos relativos às condições de hibridação necessários para alcançar

graus de rigor particulares são discutidos em Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning : . A Laboratory Manual, 2a ed, vol. 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989.

[0040] Tal como usado na presente invenção, o termo "condições rigorosas" engloba as condições em que a hibridação apenas irá ocorrer se houver menos do que 50 % de incompatibilidade entre a molécula e a hibridação do DNA alvo. "As condições rigorosas" incluem outros níveis particulares de rigor. Dessa maneira, tal como usado na presente invenção, as condições de "rigor moderado" são aquelas sob as quais as moléculas com mais de 50 % sequência de incompatibilidade não irão hibridar ; as condições de "rigor elevado" são aquelas sob as quais as sequências com mais de 20 % de incompatibilidade não irão hibridar ; e as condições de " rigor muito elevado " são aquelas sob as quais as sequências com mais de 10 % de incompatibilidade não irão hibridar.

[0041] Em modalidades particulares, as condições rigorosas podem incluir hibridação a 65 °C, seguida de lavagens a 65 °C com 0,1x SSC / SDS a 0,1 % durante 40 minutos. Seguem-se, as condições de hibridação limitantes não representativas:

[0042] • Rigor Muito elevado: A hibridação em tampão SSC 5x a 65 °C durante 16 horas; lavar duas vezes em tampão SSC 2x à temperatura ambiente durante 15 minutos cada; e lavar duas vezes em tampão SSC 0,5x a 65 °C durante 20 minutos cada.

[0043] • Elevado rigor: A hibridação em tampão SSC 5-6x a 65 a 70 °C durante 16 a 20 horas; lavar duas vezes em tampão SSC 2x à temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos cada; e lavar duas vezes em tampão SSC 1x a 55 a 70 °C durante 30 minutos cada.

[0044] • Rigor moderado: A hibridação em tampão de 6x SSC à temperatura ambiente a 55 °C durante 16 a 20 horas ; lavar, pelo me-

nos, duas vezes em tampão SSC 2-3x à temperatura ambiente a 55 ° C durante 20 a 30 minutos cada.

[0045] Em uma modalidade, as moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridação de muito elevado rigor. Em uma modalidade, as moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridação de elevado rigor. Em uma modalidade, as moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridação de rigor moderado.

[0046] Tal como usado na presente invenção, o termo "oligonucleotídeo" refere-se a um polímero de ácido nucleico curto. Os oligonucleotídeos podem ser formados por meio d clivagem de mais segmentos de ácido nucleico ou por meio da polimerização de precursores de nucleotídeos individuais. Os sintetizadores automáticos permitem a síntese de oligonucleotídeos de até várias centenas de pares de bases de comprimento. Porque os oligonucleotídeos podem ligar-se a uma sequência de nucleotídeos complementar, os mesmos podem ser usados como sondas para a detecção de DNA ou RNA . Os oligonucleotídeos compostos por DNA (oligodesoxirribonucleotídeos) podem ser usados em Reação de cadeia de polimerase, uma técnica para a amplificação de sequências de DNA pequenos. Na Reação de cadeia de polimerase, um oligonucleotídeo é tipicamente referido como um "iniciador", que permite que uma polimerase de DNA venha a se estender o oligonucleotídeo e replicar o filamento complementar.

[0047] Tal como usado na presente invenção, os termos "Reação de cadeia de polimerase" ou "PCR" referem-se a um procedimento ou técnica em que quantidades de ácido nucleico, RNA e / ou DNA, são amplificadas como descrito na patente US No. 4.683.195. Geralmente, a informação da sequência das extremidades da região de interesse

ou além precisa estar disponível, de modo a que os iniciadores oligonucleotídicos podem ser concebidos. Os iniciadores de PCR serão idênticos ou similares em sequência aos filamentos opostos do molde de ácido nucleico a ser amplificado. Os nucleotídeos do terminal 5' dos dois iniciadores podem coincidir com as extremidades do material amplificado. PCR pode ser usado para amplificar as sequências de RNA ou as sequências de DNA específicas a partir de DNA genômico total e cDNA transcrito a partir de RNA celular total, bacteriófago, ou de sequências plasmídicas, etc. Vide genericamente Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51 : 263 (1987) ; Erlich, ed., PCR Tecnologia, (Stockton Press, Nova Iorque, 1989).

[0048] Tal como usado na presente invenção, o termo "iniciador" refere-se a um oligonucleotídeo capaz de atuar como um ponto de iniciação de síntese ao longo de um filamento complementar, quando as condições são adequadas para a síntese de um produto de extensão do iniciador. As condições de síntese incluem a presença de quatro trifosfatos de desoxirribonucleotídeo diferentes (isto é, A, T, G e C) e pelo menos um agente indutor de polimerização, ou enzima, tais como transcriptase inversa ou polimerase do DNA. Estes reagentes estão tipicamente presentes em um tampão adequado, que podem incluir componentes que são cofatores ou os quais afetam as condições, tais como o pH esimilares , a várias temperaturas adequadas. Um iniciador é preferivelmente uma sequência de cadeia simples, de tal modo que a eficiência de amplificação é optimizada, mas as sequências de filamento duplo podem ser usadas.

[0049] Tal como usado na presente invenção, o termo "sonda" refere-se a uma sequência de oligonucleotídeo ou um polinucleotídeo que hibrida com uma sequência alvo. No procedimento de ensaio de estilo TaqMan ou TaqMan, a sonda hibrida com uma parte do alvo situado entre o local de hibridação dos dois iniciadores. A sonda inclui

cerca de oito nucleotídeos, cerca de dez nucleotídeos, cerca de quinze nucleotídeos, cerca de vinte nucleotídeos, cerca de trinta nucleotídeos, cerca de quarenta nucleotídeos, ou cerca de cinquenta nucleotídeos. Em algumas modalidades, inclui uma sonda a partir de cerca de oito nucleotídeos a cerca de quinze nucleotídeos.

[0050] No procedimento de ensaio de Southern blot, a sonda hibrida com um fragmento de DNA que está ligado a uma membrana. A sonda inclui cerca de dez nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, cerca de 250 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 1000 nucleotídeos, cerca de 2500 nucleotídeos, ou cerca de 5000 nucleotídeos. Em algumas modalidades, inclui uma sonda a partir de cerca de 500 nucleotídeos a cerca de 2.500 nucleotídeos.

[0051] Uma sonda pode ainda incluir um marcador detectável, tal como, um marcador radioativo, um marcador biotinilado, um fluoróforo (por exemplo, Texas-RED®, isocianato de fluoresceína, etc.,). O marcador detectável pode ser ligado covalentemente de uma maneira direta ao oligonucleotídeo da sonda, de tal modo que a etiqueta está localizada na extremidade 3' ou 5' da sonda. Uma sonda que comprehende um fluoróforo pode também incluir adicionalmente um corante extintor (por exemplo, Black Hole Quencher™, Iowa Black™, etc).

[0052] Tal como usado na presente invenção, os termos "identidade de sequência" ou "identidade" podem ser usados intermutavelmente e referem-se a resíduos de ácido nucleico em duas sequências que são iguais quando alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada.

[0053] Tal como usado na presente invenção, o termo "porcentagem de identidade de sequência" ou "porcentagem de homologia de sequência" refere-se a um valor determinado por comparação de duas sequências optimamente alinhadas (por exemplo, sequências de ácidos nucleicos ou de sequências de aminoácidos) ao longo de uma ja-

nela de comparação, em que a porção de uma sequência na janela de comparação pode compreender adições, substituições, desfasamentos, e / ou deleções (isto é, aberturas) em comparação com uma sequência de referência, a fim de obter um alinhamento óptimo das duas sequências. A porcentagem é calculada determinando o número de posições em que um resíduo de aminoácido ou ácido nucleico idênticos ocorre em ambas as sequências para obter o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para dar a porcentagem de identidade de sequência. Os métodos para o alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos. Bioinformática ou programas de computador e algoritmos de alinhamento, tais como ClustalW e Sequencher Various, são também bem conhecidos na técnica e / ou descritos em, por exemplo : Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2 : 482 ; Needleman e Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443 ; Pearson e Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 85 : 2444 ; Higgins e Sharp (1988) Gene 73 : 237-44 ; Higgins e Sharp (1989) CABIOS 5 : 151-3 ; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16 : 10881-90 ; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8 : 155-65 ; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24 : 307-31 ; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174 : 247-50.

[0054] O Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) de Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento de Local Básico (BLAST™; Altschul et al (1990) J. Mol Biol 215 : 403 a 10) está disponível a partir de várias fontes, incluindo o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (Bethesda, MD) e na Internet, para usar em ligação com vários programas de análise de sequências. Uma descrição de como determinar a identidade de sequência usando este programa está disponível na internet, na seção "ajuda" para BLAST™.

Para comparações de sequências de ácidos nucleicos, a função de "sequências Blast 2" do programa BLAST™ (Blastn) podem ser empregues usando os parâmetros padrão. As sequências de ácidos nucleicos com maior semelhança com as sequências de referência irão indicar o crescimento da porcentagem de identidade quando avaliadas por meio deste método.

[0055] Tal como usado na presente invenção, o termo "de uma forma operativa ligado" refere-se a um ácido nucleico colocado em uma relação funcional com outro ácido nucleico. Geralmente, "de uma forma operativa ligado" pode significar que os ácidos nucleicos ligados são contíguos. A ligação pode ser conseguida por meio da ligação em locais de restrição convenientes. Se tais locais não existirem, os adaptadores ou ligantes oligonucleotídicos sintéticos são ligados ou reconhecidos para o ácido nucleico e usados para ligar o fragmento polinucleotídico contíguo. No entanto, os elementos precisam ser contíguos para serem ligados operacionalmente.

[0056] Tal como usado na presente invenção, o termo "promotor" refere-se a uma região de DNA que está geralmente localizada a montante de um gene (ou seja, para a extremidade 5' de um gene) e é necessário para iniciar e dirigir a transcrição do gene. Um promotor pode permitir a ativação adequada ou a repressão de um gene que o mesmo controla. Um promotor pode conter sequências específicas que são reconhecidas por meio dos fatores de transcrição. Estes fatores podem ligar-se a uma sequência de DNA do promotor, o que resulta no recrutamento de RNA polimerase, uma enzima que sintetiza RNA a partir da região de codificação do gene. O promotor refere-se geralmente a todos os elementos de regulamentação do gene localizados a montante do gene, incluindo, 5'-UTR, ítrons, e sequências líder.

[0057] Tal como usado na presente invenção, o termo "promotor a montante" refere-se a uma sequência polinucleotídica contígua que é

suficiente para iniciação da transcrição direta. Tal como usado na presente invenção, um promotor a montante engloba o local de iniciação da transcrição com vários motivos de sequências, que incluem uma caixa TATA, sequência iniciadores (Intr), elementos de reconhecimento TFIIB (BRE), e outros motivos do promotor (Jennifer, EF et al, (2002) Genes & Dev., 16 : 2583 a 2592). O promotor a montante, fornece o local de ação de RNA polimerase II, uma enzima de subunidades múltiplas com os fatores de transcrição geral ou basais como, TFIIA, B, D, E, F, e H. Estes fatores montam em um complexo de pré-iniciação da transcrição (PIC), que catalisa a síntese de RNA a partir de um molde de DNA .

[0058] A ativação do promotor a montante, é realizada por meio da adição de elementos de sequência de DNA de regulação para a qual se ligam várias proteínas e, subsequentemente, interagem com o complexo de iniciação da transcrição para ativar a expressão do gene. Estas sequências de elemento de regulação de gene interagem com os fatores de ligação de DNA específicos. Estes motivos de sequência podem, por vezes, ser referidos como elementos cis. Tais elementos cis, em que os fatores de transcrição específicos do desenvolvimento ou específicos de tecidos se ligam, individualmente ou em combinação, podem determinar o padrão de expressão espaço-temporal de um promotor ao nível da transcrição. Estes elementos cis variam muito no tipo de controle que exercem sobre genes ligados operacionalmente. Alguns elementos atuam para aumentar a transcrição de genes ligados operacionalmente em resposta às respostas ambientais (por exemplo, temperatura, umidade, e o ferimento). Outros elementos cis podem responder a estímulos de desenvolvimento (por exemplo, germinação, maturação das sementes, e floração) ou à informação espacial (por exemplo, a especificidade de tecido). Vide, por exemplo, Langridge et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86 : 3219 a 23. Es-

tes elementos cis estão localizados a uma distância que varia entre o ponto de inicio da transcrição. Alguns elementos cis (chamados elementos proximais) são adjacentes a uma região promotora mínima do núcleo, enquanto outros elementos podem ser posicionados vários quilabases 5' a montante ou 3' a jusante do promotor (potenciadores).

[0059] Tal como usado na presente invenção, o termo "transformação" engloba todas as técnicas em que uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida em uma célula. Exemplos incluem, mas não estão limitados a: a transfecção com vetores virais ; transformação com vetores plasmídicos ; eletroporação ; lipofeção ; microinjecção (Mueller et al (1978) Cell 15 : 579 a 85) ; Transferência mediada por Agrobacterium ; absorção direta de DNA ; transformação mediada por WHISKERS™ ; e bombardeamento de microprojéteis. Estes podem ser usados tanto para as técnicas de transformação estáveis quanto a expressão transiente de uma célula de planta. "Transformação estável" refere-se à introdução de um fragmento de ácido nucleico para dentro de um genoma de um organismo hospedeiro, resultando em herança geneticamente estável. Uma vez estavelmente transformado, o fragmento de ácido nucleico é estavelmente integrado no genoma do organismo hospedeiro e qualquer geração subsequente. Organismos hospedeiros contendo os fragmentos de ácido nucleico transformados são referidos como organismos "transgênicos". "Transformação transitória" refere-se à introdução de um fragmento de ácido nucleico para o núcleo ou organelo que contém DNA de um organismo hospedeiro, resultando na expressão do gene sem herança geneticamente estável.

[0060] Tal como usado na presente invenção, o termo "traduz" refere-se a um processo onde um vírus transfere ácido nucleico em uma célula.

[0061] Tal como usado na presente invenção, o termo "transgene" refere-se a uma sequência de ácido nucleico exógeno. Em um exem-

plo, um transgene é uma sequência de genes (por exemplo, um gene de resistência ao herbicida), um gene que codifica um composto industrialmente ou farmaceuticamente útil, ou um gene que codifica um traço desejável agrícola. Em ainda outro exemplo, um transgene é uma sequência de ácido nucleico antisentido, em que a expressão da sequência de ácido nucleico anti-sentido inibe a expressão de uma sequência de ácido nucleico alvo. Um transgene pode conter sequências de regulação de uma forma operativa ligadas ao transgene (por exemplo, um promotor, ítron, 5'-UTR, ou 3'-UTR). Em algumas modalidades, um ácido nucleico de interesse é um transgene. No entanto, em outras modalidades, um ácido nucleico de interesse é um ácido nucleico endógeno, em que são desejadas cópias genômicas adicionais de ácido nucleico endógeno, ou um ácido nucleico que está na orientação antisentido em relação à sequência de um ácido nucleico alvo em um organismo hospedeiro.

[0062] Tal como usado na presente invenção, o termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico tal como introduzido em uma célula, produzindo assim uma célula transformada. Um vetor pode incluir as sequências de ácidos nucleicos que permitem a sua replicação na célula hospedeira, tais como uma origem de replicação. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, um plasmídeo, cosmídeo, bacteriófago, cromossoma artificial bacteriano (BAC), ou vírus que transporta o DNA exógeno em uma célula. Um vetor pode também incluir um ou mais genes, moléculas antisentido, genes marcadores selecionáveis, e outros elementos genéticos conhecidos na técnica. Um vetor pode transduzir, transformar, ou infectar uma célula, fazendo assim com que a célula venha a expressar as moléculas de ácido nucleico e / ou proteínas codificadas por meio do vetor. Um vetor pode incluir, opcionalmente, materiais para auxiliar na obtenção de entrada da molécula de ácido nucleico na célula (por exemplo, um lipossoma).

[0063] Tal como usado na presente invenção, os termos "cassete", "cassete de expressão" e "cassete de expressão do gene" refere-se a um segmento de DNA que pode ser inserido um ácido nucleico ou polinucleotídeo em locais de restrição específicos ou por meio da recombinação homóloga. Um segmento de DNA compreende um polinucleotídeo contendo um gene de interesse que codifica para um pequeno RNA ou um polipeptídeo de interesse, e os locais de restrição e de cassetes são concebidos para assegurar a inserção da cassette na grelha de leitura correta para a transcrição e tradução. Em uma modalidade, um cassete de expressão pode incluir um polinucleotídeo que codifica um pequeno RNA ou um polipeptídeo de interesse e pode ter elementos em adição ao polinucleotídeo que facilitam a transformação de uma célula hospedeira particular. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene pode também incluir elementos que permitem a expressão aumentada de um pequeno RNA ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse em uma célula hospedeira. Estes elementos podem incluir, mas não estão limitados a : um promotor, um promotor mínimo, um potenciador, um elemento de resposta, um ítron, 5'-UTR, 3'-UTR, uma sequência de terminação, uma sequência de poliadenilação, e similares.

[0064] Tal como usado na presente invenção, o termo "sequência de codificação heteróloga" é usado para indicar qualquer polinucleotídeo que codifica para, ou, finalmente codifica, um peptídeo ou uma proteína ou a sua sequência de aminoácido equivalente, por exemplo, uma enzima, que não está normalmente presente no hospedeiro organismo e pode ser expresso na célula hospedeira em condições adequadas. Como tal, as "sequências de codificação heterólogas" podem incluir uma ou cópias adicionais de sequências de codificação que não estão normalmente presentes na célula hospedeira, de tal modo que a célula expressa de cópias adicionais de uma sequência de codificação

que não estão normalmente presentes nas células. As sequências de codificação heterólogas podem ser RNA ou qualquer tipo dos mesmos (por exemplo, mRNA), ou qualquer tipo de DNA da mesma (por exemplo, cDNA), ou um híbrido de RNA / DNA . Exemplos de sequências de codificação incluem, mas não estão limitadas a, unidades de transcrição de tamanho completo que compreendem tais características como a sequência de codificação, ítrons, regiões promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR, e regiões potenciadoras.

[0065] "Sequências de codificação heterólogas" também incluem a porção codificadora do peptídeo ou uma enzima (ou seja, o cDNA ou sequência de mRNA), a porção de codificação da unidade de transcrição de comprimento completo (isto é, o gene que compreende ítrons e exons), "códons optimizados" sequências, sequências truncadas ou outras formas de sequências alterados que codificam para a enzima ou código para a sua sequência de aminoácido equivalente, desde que a sequência de aminoácidos produz uma proteína equivalente funcional. Tais sequências de aminoácidos equivalentes podem ter uma deleção de um ou mais aminoácidos, com a exclusão de ser Terminal N, Terminal C ou interna. As formas truncadas são previstas, enquanto elas têm a capacidade catalítica indicada na presente invenção.

[0066] Tal como usado na presente invenção, o termo "controle" refere-se a uma amostra usada no procedimento analítico para fins de comparação. Um controle pode ser "positivo" ou "negativo". Por exemplo, quando o objetivo é um procedimento analítico para detectar um transcrito expresso diferencialmente ou do polipeptídeo nas células ou tecidos, é geralmente preferível incluir um controle positivo, tal como uma amostra de uma planta conhecida que exibe a expressão desejada, e um sinal negativo de controle, tal como uma amostra de uma planta conhecida que falta a expressão desejada.

[0067] Tal como usado na presente invenção, o termo "planta" in-

clui plantas e partes de plantas incluindo, mas não se limitando a, células de plantas e tecidos de plantas, tais como folhas, calos, caules, raízes, flores, pólen e sementes. A classe de plantas que pode ser usada na presente invenção é geralmente tão ampla como a classe de plantas superiores e inferiores passíveis de mutagênese incluindo angiospérmicas, gimnospérmicas, samambaias e algas multicelulares. Dessa maneira, o termo "planta" inclui plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Exemplos de plantas dicotiledôneas incluem o tabaco, a *Arabidopsis*, soja, tomate, papaia, canola, girassol, algodão, alfafa, batata, videira, ervilha de Angola, ervilha, *Brassica*, grão de bico, beterraba sacarina, colza, melancia, melão, pimenta, amendoim, abóbora, rabanete, espinafre, abóbora, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, couve chinesa, pepino, berinjela, e alface. Exemplos de plantas monocotiledôneas incluem milho, arroz, trigo, cana de açúcar, cevada, centeio, sorgo, orquídeas, bambu, banana, cattails, lírios, aveia, cebola, milho, trigo e triticale.

[0068] Tal como usado na presente invenção, o termo "material de planta" refere-se a folhas, calos, caules, raízes, flores ou partes de flores, frutos, pólen, células ovo, zigotos, sementes, estacas, culturas de células ou de tecidos, ou qualquer outra parte ou de produtos uma planta. Em uma modalidade, o material da planta inclui cotilédone e folha. Em uma modalidade, o material da planta inclui tecidos da raiz ou outros tecidos de plantas localizados no subsolo.

[0069] Tal como usado na presente invenção, o termo "gene marcador selecionável" refere-se a um gene que é opcionalmente usado na transformação de plantas, por exemplo, protegendo as células de plantas a partir de um agente seletivo, ou fornece resistência / tolerância a um agente seletivo. Além disso, o "gene marcador selecionável" pretende abranger os genes repórter. Só as células ou plantas que recebem um marcador de seleção funcional são capazes de dividir ou

cultivar em condições com um agente seletivo. Exemplos de agentes seletivos podem incluir, por exemplo, antibióticos, incluindo a espectinomicina, neomicina, canamicina, a paramomicina, a gentamicina, e higromicina. Estes marcadores selecionáveis incluem fosfotransferase de neomicina (nptII), que expressam uma enzima que confere resistência ao antibiótico de canamicina e os genes para os antibióticos relacionados à neomicina, a paromomicina, a gentamicina, e a G418, ou o gene de fosfotransferase de higromicina (HPT), que expressa uma enzima que confere resistência à higromicina. Outros genes marcadores selecionáveis podem incluir genes que codificam resistência a herbicidas, incluindo bar ou pat (resistência contra herbicida glufosinato de amônio ou fosfinotricina), acetolactato sintase (ALS, a resistência contra inibidores tais como sulfoniluréias (SUS), imidazolinonas (IMIS), triazolopirimidinas (TPs), oxibenzoatos de pirimidinila (POHs), e sulfonylamo carbonil triazolinonas impedem a primeiro etapa na síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada), glifosato, 2,4-D, e resistência a metais ou sensibilidade. Exemplos de "genes repórter" que podem ser usados como um gene marcador de seleção inclui a observação visual das proteínas expressas de gene repórter, que codificam proteínas tais como β -glucuronidase (GUS), luciferase, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarela (YFP), DsRed, β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), fosfatase alcalina, esimilares. A expressão "marcador positivo" refere-se a plantas que foram transformadas de modo a incluir um gene marcador selecionável.

[0070] Tal como usado na presente invenção, o termo "marcador detectável" refere-se a um marcador capaz de detecção, tais como, por exemplo, um radioisótopo, um composto fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelante de metais ou enzima. Exemplos de marcadores detectáveis incluem, mas

não estão limitados aos seguintes : marcadores fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, lantanideos fosforescentes), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimiluminescentes, grupos biotinila , epítopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por meio de um repórter secundário (por exemplo, sequências de pares de leucina zipper, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epitopo). Em uma modalidade, um marcador detectável pode ser ligado por meio de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estereoquímico potencial.

[0071] Tal como usado na presente invenção, o termo "detecção" é usado no sentido mais amplo para incluir tanto as medições qualitativas e quantitativas de uma molécula específica, por exemplo, medições de um polipeptídeo específico.

[0072] A menos que seja de uma outra forma especificamente explicado, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado que o normalmente entendido por meio daqueles que são videsados na técnica ao qual esta descrição pertence. As definições dos termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em, por exemplo: Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 ; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 ; e Meyers (ed.), Biologia Molecular e Biotecnologia : A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995.

Os promotores como elementos de regulamentação de expressão do gene

[0073] Os promotores de plantas usados para aplicações de pesquisa básica ou biotecnológicas são geralmente unidireccionais, comandam a expressão constitutiva de um transgene que foi fundido

com a sua extremidade 3' (a jusante). Muitas vezes é necessário para expressar de forma robusta os transgenes dentro das plantas para engenharia metabólica e traço de empilhamento. Além disso, vários novos promotores são normalmente necessários em culturas transgênicas para conduzir a expressão de múltiplos genes. Descreve-se na presente invenção um promotor constitutivo que pode dirigir a expressão de um transgene que foi fundido na sua extremidade 3' .

[0074] O desenvolvimento de produtos transgênicos está se tornando cada vez mais complexo, o que exige robustamente expressar os transgenes e empilhar vários transgenes em um único lugar. Tradicionalmente, cada um transgene requer um único promotor para expressão em que vários promotores são necessários para expressar os transgenes diferentes dentro de uma pilha de genes. Com um tamanho crescente de pilhas de genes, este método conduz frequentemente a utilização repetida do mesmo promotor para obter níveis semelhantes de diferentes padrões de expressão de transgenes para expressão de um único traço poligênico.

[0075] Os construtos multigenes conduzidos por meio do mesmo promotor são conhecidos por causar o silenciamento do gene, resultando em produtos transgênicos menos eficazes no campo. O excesso dos locais de ligação ao fator de transcrição (TF) devido a repetição de promotor pode causar depleção de TFs endógenos os quais conduzem à inativação transcracional. O silenciamento de transgenes é suscetível de afetar indesejavelmente o desempenho de uma planta transgênica produzida para expressar os transgenes. As sequências repetitivas dentro de um transgene podem levar ao local intra gene de recombinação homóloga resultando em rearranjos de polinucleotídeos.

[0076] Além de promotores constitutivos, os promotores específicos de tecido, ou específicos de órgãos conduzem a expressão de genes em determinados tecidos tais como no núcleo, raiz, folha, calo,

pólen, tapete ou da planta. Os tecidos e estágios de desenvolvimento promotores específicos que conduzem a expressão de genes são expressos em tecidos específicos ou em determinados períodos de tempo durante o desenvolvimento da planta. Os promotores específicos de tecidos são necessários para certas aplicações na indústria de planta transgênica e são desejáveis uma vez que permitem a expressão específica dos genes heterólogos em um tecido e / ou em uma fase de desenvolvimento selecionada, indicando a expressão do gene heterólogo diferencialmente em vários órgãos, tecidos, e / ou em momentos diferentes, mas não outros.

[0077] Por exemplo, o aumento da resistência de uma planta à infecção por agentes patogênicos nascidos no solo pode ser realizado por meio da transformação do genoma de uma planta com um gene de resistência à patógeno de tal modo que uma proteína de resistência ao agente patogênico é robustamente expressa no interior da planta. De uma forma alternativa, pode ser desejável expressar um transgene em tecidos de plantas que se encontram em particular de crescimento ou fase de desenvolvimento, tais como, por exemplo, divisão celular ou alongamento. Outra aplicação é a conveniência do uso de promotores específicos de tecido, de tal modo que os promotores iriam limitar a expressão dos transgenes que codifica uma característica agronômica no desenvolvimento de partes da planta (isto é, raízes, folhas, caules, ou pólen).

[0078] Os promotores descritos na presente invenção são ferramentas promissoras para fazer os constructos transgênicos comerciais contendo vários genes. Estes promotores também fornecem estabilidade estrutural em hospedeiros bacterianos e estabilidade funcional em células de plantas, tais como a redução do silenciamento do transgene, para permitir a expressão do transgene. Os promotores com diferentes gamas de expressão também podem ser obtidos empregando

os métodos descritos na presente invenção. Em comparação com os constructos de transgenes que utilizam um único promotor de várias vezes, os constructos diversificados do promotor descritos neste pedido são mais compatíveis para análises moleculares a jusante de acontecimentos transgênicos. Uso dos promotores diversificados descritos na presente invenção podem também aliviar rearranjos em locais de múltiplos genes transgênicos durante o direcionamento com tecnologia de dedo de zinco (SHUKLA et al., 2009).

Promotores Zea mays ubiquitina-1

[0079] O promotor *Zea mays* Ubi-1 tem sido um padrão da indústria de biotecnologia, usado predominantemente para alta, estável expressão transgênica em milho (CHRISTENSEN e QUAIL 1996 ; CHRISTENSEN et al 1992 ; TOKI et al., 1992). Cada transgene geralmente requer um promotor específico para a expressão suficiente. Vários promotores são normalmente necessários para expressar transgenes diferentes dentro de uma pilha de genes. Este paradigma frequentemente leva ao uso repetitivo do promotor *Z. mays* Ubi-1 devido a seus altos níveis de expressão da proteína e padrão de expressão constitutivo desejados.

[0080] No entanto, a introdução deliberada de sequências repetitivas em um local transgênico também pode levar a efeitos negativos indesejáveis sobre a expressão do transgene e a estabilidade (Fladung e Kumar 2002 ; Kumar e Fladung 2000a ; 2000b KUMAR e Fladung ; Kumar e Fladung 2001a ; 2001b KUMAR e Fladung ; Kumar e Fladung 2002 ; METTE et al, 1999 ; MOURRAIN et al 2007). O desafio de expressão do transgene coordenada múltipla pode ser abordado usando uma abordagem de promotor de diversidade, em que diferentes promotores são usados para conduzir os transgenes diferentes com o mesmo perfil de expressão (PEREMARTI et al. 2010). Este pedido descreve uma sequência promotora Ubi-1 diversificada obtida a-

través da identificação e purificação do novo promotor de diferentes genótipos de *Zea mays*.

[0081] A iniciação da transcrição e a modulação da expressão do gene em genes de plantas são dirigidas por meio de uma variedade de elementos de sequência de DNA coletivamente dispostos em uma sequência maior chamada um promotor. Os promotores eucarióticos consistem tipicamente em um promotor mínimo do núcleo e as sequências de regulação a montante. O promotor núcleo é uma extensão mínima da sequência de DNA contígua que é suficiente para dirigir a iniciação da transcrição precisas. Os promotores do núcleo em plantas geralmente compreendem as regiões canônicas associadas com a iniciação da transcrição, tais como caixas CAAT e TATA (sequência de consenso TATAWAW). O elemento da caixa TATA é normalmente localizado aproximadamente 20 a 35 pares de bases (pb) a montante do local de início da transcrição (SAT). A ativação do promotor núcleo é realizada por meio das sequências de regulação a montante ao qual se ligam várias proteínas e, subsequentemente, interagem com o complexo de iniciação da transcrição para ativar a expressão do gene. Estes elementos de regulamentação compreendem as sequências de DNA que determinam o padrão de expressão espacial e temporal de um promotor.

[0082] Com referência à FIGURA 1, o promotor do Gene *Z. mays* Ubi-1 é derivado do *Z. mays* consanguíneo da linhagem celular B73. O promotor *Z. mays* Ubi-1 é composto de aproximadamente 895bp da sequência de DNA localizada a 5' a montante do TSS (isto é, o elemento a montante). Além disso, o Promotor *Z. mays* Ubi-1 é composto de cerca de 1093bp de sequência de DNA localizada a 3' a jusante do TSS (vide a Patente US No. 5.510.474). Dessa maneira, o Promotor *Z. mays* Ubi-1 é composto por cerca de 2 pares de bases (kb) Kilo de sequência total de DNA .

[0083] O elemento a montante da *Z. mays* Ubi-1 compreende um promotor caixa TATA localizado aproximadamente 30 pb a 5' a montante do TSS (FIGURAS. 1 e 3). Além disso, o elemento a montante compreende dois elementos de consenso de choque térmico que se sobrepõem localizados imediatamente a 5' a montante do TSS. Um 82bp 5'-UTR ou a sequência líder está localizada imediatamente a 3' a jusante do TSS e é seguida por um ítron que se estende a partir da base 83 a1093 (FIGURAS 1. e 3).

[0084] Os trabalhos anteriores têm descrito o aumento da expressão gênica de genes e / ou transgenes regulamentados or meio do Promotor *Z. mays* Ubi-1. Por exemplo, a fusão de transcrição do gene da cloranfenicol-acetiltransferase (CAT) para o Promotor *Z. mays* Ubi-1 produziu mais de 10 vezes superior o nível de atividade de CAT em protoplastos de milho do que a expressão conduzida pelo promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S (CHRISTENSEN e QUAIL 1996 ; Christensen et al 1992)..

[0085] Em adição ao Promotor *Z. mays* Ubi-1 de controle, este pedido descreve um novo Promotor Ubi-1 de milho. Ao contrário do Promotor Ubi-1 de controle derivado a partir de *Z. mays* genótipo cv B73, o novo Promotor Ubi-1 foi derivado de *Z. mays* genótipo cv Hi-II. São fornecidos constructos e métodos que utilizam um Promotor *Z. mays* Ubi-1 que compreende uma sequência polinucleotídica. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos a partir de *Z. mays* cv B73 Gene Ubi-1 como se segue :

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCAT
TGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCAACATATTTTTGTACAC
TTGTTGAAGTGCAGTTATCTATCTTATACATATTTAAACTTTA
CTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATCAGTGT
AGAGAATCATATAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATT
GAGTATTTGACAAACAGGACTCTACAGTTATCTTTAGTGTGC

ATGTGTTCTCCTTTTTGCAAATAGCTCACCTATATAACTT
CATCCATTATTAGTACATCCATTAGGGTTAGGGTTATGGTT
TTATAGACTAATTTTTAGTACATCTATTTATTCTATTTAGCCTC
TAAATTAAGAAAACAAAACTCTATTTAGTTTTATTAATAGTT
TAGATATAAAAATAGAATAAAATAAGTGAACAAAAATTAAACAAATA
CCCTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTCTTGTTCGA
GTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA
CACCAACCAGCGAACCAAGCAGCGTCGCGTGGGCCAAGCGAACG
AGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG
AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAA
ATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCAGG
CCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGAGCTACGGGGATTCCCTT
CCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCGCCGTAATAAAATA
GACACCCCCCTCCACACCCCTCTTCCCCAACCTCGTGTGTTCGGA
GCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGG
CACCTCCGCTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCC
CCTCTCTACCTTCTCTAGATCGCGTCCGGTCCATGCATGGTTA
GGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGTGTTAGATCCGTGT
TTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCTGTCACACGGATGCGACCT
GTACGTAGACACCGTTCTGATTGCTAACTGCCAGTGTTCTCTT
GGGAATCCTGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGA
TTTCATGATTTTTTGTTCGTTGCATAGGGTTGGTTGCCCTT
TCCTTATTCATATGCCGTGCACCTGTTGTCGGTCATCTT
TCATGCTTTTTGTCTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGC
GGCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTCAAACACCTGGTG
GATTATTAAATTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATTCAAG
TTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTA
TACATGTTGATGCCGGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTT
TGTCGCTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTGGCGGTGTTCA
TTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACCTGGTGTA

TTTATTAATTTGGAACGTATGTGTGTACATACATCTTCATAGTT
 ACGAGTTAACGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACAT
 GTTGATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGC
 ATCTATTATGCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAAC
 AAGTATGTTTATAATTATTCGATCTGATATACTTGGATGATGGC
 ATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTAGCCCTGCCCTCATACG
 CTATTTATTCGTTGGTACTGTTCTTGTGATGCTCACCTGTT
 GTTGGTGTACTCTGCA (SEQ ID NO : 1)

[0086] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo a partir de *Z. mays* c.v. Hi-II Gene Ubi-1 como segue :

GACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCT
 AAGTTATAAAAAATTACCAACATTAAAGTGCAGTTACGTATCT
 CTATACATATATTAAACTTACTATACGAATAATATAGTTATAATA
 CTAAAATAATATCAGTGTAGAGAATTATATAAAATGAACGTGCTAG
 ACATGGTCTAAATAACAATTGAGTGTGACAAACAGGACTCTACA
 GTTTATCTTTAGTGTGCATGTGCCTATTTTTTGCAAATA
 GCTTCACCTATATAACTTCACCAATTATTAGTACATCCATTAG
 GGTTAGGGTAATGGTTCTAGACTAATTAGTACATCTATT
 TTATTCTATTAGCCTCTAAATTAAAGAAAATTTAGTACATCTATT
 TTTTTAATAATTAGATATAAAAGAATAAAATAAGTACTAAAA
 ATTAACCTAAACCTTTAAAAAAATAAAACTAAGGAAACATT
 TCTTGTCCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCCGTCGACG
 AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTCGG
 CCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTGTCGCTGCCTCTGGA
 CCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTC
 GGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGC
 ACGGCAGGCGGCCTTCCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACG
 GGGGATTCCCTTCCCACCGCTCCCTCGCTTCCCTCCTCGCCCG
 CCGTAATAAATAGACACCCCCCTCCACACCCCTTTCCCCAACCTC

GTGTCGTTGGAGCGCACACACACACACAACCAGATCTCCCCAAA
 TCCACCCGTCGGCACCTCCGCTCAAGGTACGCCGCTCATCCTCC
 CCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTCTAGATGGCGTTCCGGT
 CCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGTGTTA
 GATCCGTGTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGG
 ATGCGACCTGTACATCAGACATGTTCTGATTGCTAACTGCCAGTG
 TTTCTTTGGGAATCCTGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGAC
 GGGATCGATTCATGATTTTTGTTGTTGCATAGGGTTGGT
 TTGCCCTTCCTTATTCATGATGTTGTTGCAGAC
 GTCATCTTCATGTTTTGGCTGGTTGTGATGATGTGGTCT
 GGTTGGCGGTGTTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAA
 ACCTGGTGGATTATTAAAGGATCTGTATGTATGCCATACATCT
 TCATAGTTACGAGTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGA
 TAGGTATACATGTTGATGCCGGTTACTGATGCATATACAGAGAT
 GCTTTTTTCGCTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTGGCGGT
 CGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAA
 ACTGGTGGATT
 TATTAATTGGATCTGTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTAC
 GAGTTAAGATGATGGATGGAAGTATCGATCTAGGATAGGTATAC
 ATGTTGATGTTGGTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCA
 GCATCTATTCAATTGCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATA
 ATAAACAAGTATGTTATAATTATTTGATCTGATATACTGGAT
 GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTGGTAGCTCTGCCTT
 CATACGCTATTATTCGCTGGTACTGTTCTTGTGATGCTCAC
 CCTGTTGTTGGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO : 2)

[0087] Os promotores descritos na presente invenção foram caracterizados por meio da clonagem de DNA e subsequente análise de homologia de sequência para identificar as regiões específicas do promotor (isto é, a montante do promotor, 5'-UTR, e regiões de íntrons). Os constructos e métodos previstos estão usando um Promotor Ubi-1 Z. mays constitutivo que compreende as sequências polinucleo-

tidicas de uma região de promotor a montante, 5-UTR ou região líder, e um íntron para expressar os transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo do promotor a montante a partir do Gene Ubi-1 Z. mays cv B73 como se segue :

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCAT
 TGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTGTACAC
 TTGTTGAAGTGCAGTTATCTATCTTATACATATATTAAACTTA
 CTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGT
 AGAGAATCATATAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATT
 GAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTATCTTTAGTGT
 ATGTGTTCTCCTTTTTGCAAATAGCTTACCTATATAACTT
 CATCCATTTATTAGTACATCCATTAGGTTAGGGTTAATGGTT
 TTATAGACTAATTTTTAGTACATCTATTTATTCTATTTAGCCTC
 TAAATTAAAGAAAACAACTCTATTTAGTTTTTATTAATAGTT
 TAGATATAAAATAGAATAAAATAAGTGAACAAACTAAACAAATA
 CCCTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTCTTGTTCGA
 GTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA
 CACCAACCAGCGAACCAAGCAGCGTCGCGTGGGCCAGCGAAC
 AGACGGCACGGCATCTGTGCGCTGCCTCTGGACCCCTCGAG
 AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAA
 ATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGG
 CCTCCTCCTCCTCAGGCACCGGCAGCTACGGGGATTCCCTT
 CCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAATAAAATA
 GACACCCCTCCACACCCCTTT (SEQ ID NO : 3)

[0088] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo do promotor a montante a partir do Gene Ubi-1 Z. mays c.v. Hi-II como segue :

GACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAAAAGAGCATTGCATGTCT
 AAGTTATAAAAAATTACCACAAATTAAAGTGCAGTTACGTATCT

CTATACATATATTAAACTTTACTATACGAATAATATAGTTATAATA
 CTAAAATAATATCAGTGTAGAGAATTATATAATGAACTGCTAG
 ACATGGTCTAAATAACAATTGAGTGTTGACAACAGGACTCTACA
 GTTTATCTTTAGTGTGCATGTGCCTATTTTTTGCAAATA
 GCTTCACCTATATAACTTCACCAATTATTAGTACATCCATTAG
 GGTTAGGGTTAATGGTTCTATAGACTAATTTTAGTACATCTATT
 TTATTCTATTTAGCCTCTAAATTAAGAAAACAAACTTTATTAG
 TTTTTAATAATTAGATATAAAAGAATAAAATAAGTGA
 ATAAACTAAATACCTTAAAAAAATAAAAAACTAAGGAAACATT
 TCTTGTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTAACGCCGTCGACG
 AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAGCGTCGCGTCGGG
 CCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGA
 CCCCTCTCGAGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTC
 GGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGC
 ACGGCAGGCAGGCCTCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACG
 GGGGATTCCCTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCG
 CCGTAATAATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT (SEQ ID NO : 4)

Elementos de regulamentação dos Genes adicionais

[0089] A expressão de transgenes pode também ser regulada por uma região 5'-UTR e / ou ítron localizada 3' a jusante da sequência do promotor a montante. Um promotor que compreende uma região do promotor a montante operacionalmente ligado a um 5'-UTR e / ou ítron pode regular a expressão do transgene. Embora um promotor a montante seja necessário para dirigir a transcrição, a presença de um 5'-UTR e / ou ítron pode aumentar os níveis de expressão que resultam na produção de mais transcritos de mRNA para tradução e síntese de proteínas. A adição de um 5'-UTR e / ou ítron de uma sequência de polinucleotídeo do promotor a montante pode auxiliar-expressão estável de um transgene.

[0090] Além disso, um promotor constitutivo que compreende uma

sequência de polinucleotídeo de promotor a montante pode ser seguida por uma 5'-UTR ou a região líder para ajudar na expressão de transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender 5'-UTR ou uma sequência líder polinucleotídeo do Gene Ubi-1 Z. mays c.v. B73 como se segue :

TCCCCAACCTCGTGTGTCGGAGCGCACACACACACAACCAGAT
CTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO : 5)

[0091] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender 5'-UTR ou uma sequência líder do polinucleotídeo a partir do Gene Ubi-1 Z. mays c.v. Hi-II como se segue :

TCCCCAACCTCGTGTGTCGGAGCGCACACACACACAACCAGA
TCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO : 6)

[0092] Além disso, um promotor constitutivo que compreende um polinucleotídeo de promotor a montante seguido de uma sequência de 5'-UTR ou a região líder também pode ser seguido por um ítron para ajudar na expressão de transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos intrônica a partir do Gene Ubi-1 Z. mays c.v. B73 como se segue :

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTACCTTCTCT
AGATCGGCGTTCCGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCGTAGTTCTA
CTTCTGTTCATGTTGTGTTAGATCCGTGTTGTGTTAGATCCGTG
CTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTACAGACACGTT
CTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTCTCTTGGGAATCCTGGAT
GGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTCTGATTGGGGAT
TTTCGTTGCATAGGGTTGGTTGCCCTTTCTTATTTCAATATA
TGCCGTGCACTTGTTGTCGGTCATCTTCTGCTTTTTGT
CTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGCGGTCGTTCTAGATCG
GAGTAGAATTCTGTTCAAACCTGGTGGATTATTAATTGG

ATCTGTATGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGAT
 GATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCG
 GGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTGTTCGCTGGTTG
 TGATGATGTGGTGTGGTGGCGGTCGTTCATCGTTCTAGATCG
 GAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGTATTATTAATTGG
 ACTGTATGTGTGTACATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATG
 GATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGTT
 TACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGC
 TCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTATA
 ATTATTCGATCTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCT
 ATATGTGGATTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTATTCGTT
 GGTACTGTTCTTGTGATGCTC-
 CCCTGTTGTTGGTGTACTTCTGCA (SEQ ID NO : 7)

[0093] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo intrônica a partir do Gene Ubi-1 Z. mays c.v. Hi-II como se segue :

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCT
 CTAGATCGCGTTCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACT
 TCTGTTCATGTTGTGTTAGATCCGTGTTGTGTTAGATCCGTGCT
 GCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGACATGTTCT
 GATTGCTAACTGCCAGTGTCTCTTGGGAATCCTGGGATGG
 CTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATGATTTTTGTT
 TCGTTGCATAGGGTTGGTTGCCCTTCCATTCAATATATG
 CCGTGCACCTGTTGTCGGGTACATCTTCATGTTTTGGCTT
 GGTTGTGATGATGTGGCTGGTTGGCGGTGTTAGATCGGA
 GTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGATTATTAAGGATCTG
 TATGTATGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGATGG
 ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTT
 ACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTCGCTGGTTGTGATG
 ATGTGGTCTGGTTGGCGGTGTTAGATCGGAGTAGAATACTG

TTTCAAACTAACTGGTGGATTATTAATTGGATCTGTATGTGTGT
 GCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAACAGATGATGGATGGAAGTA
 TCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTTGGTTACTGATGCA
 TATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCAATTGCTCTAAC
 CTTGAGTACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTATAATTATT
 TGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTG
 GATTTTTTAGCTCTGCCTTCATACGCTATTATTGCTTGGTACTG
 TTTCTTTGTCGATGCTCACCCGTGTTGGTACTTCTGCAG
 (SEQ ID NO: 8)

Cassetes de Expressão do Transgene e Gene Repórter

[0094] A expressão de transgenes pode também ser regulada por meio de um cassete de expressão do gene. Em uma modalidade, um cassete de expressão compreende um promotor do gene. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor Ubi-1. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor Ubi-1 a partir de uma planta. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor Ubi-1 a partir de *Z. mays* cv Hi-II.

[0095] Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II, em que o promotor é pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntico à SEQ ID NO : 2. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor constitutivo, tal como o Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II, que está operacionalmente ligado a um gene repórter ou um transgene. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor constitutivo que é de uma forma operativa ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de efici-

ência de utilização de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação ao DNA , um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um cassete de expressão de genes que compreende o promotor constitutivo pode dirigir a expressão de um ou mais transgenes ou genes repórter. Em uma modalidade, um cassete de expressão de genes que compreende o promotor constitutivo pode dirigir a expressão de dois ou mais transgenes ou genes repórter.

[0096] Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II, em que a sequência do promotor a montante é, pelo menos, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO : 4. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor constitutivo, tal como o promotor Ubi-1Z. mays cv Hi-II a montante, que está operacionalmente ligada a um gene repórter ou um transgene. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um promotor constitutivo a montante que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de eficiência de utilização de água, uma transgene qualidade nutricional, um transgene de ligação ao DNA , um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um cassete de expressão de genes que compreende o promotor a montante constitutivo, pode dirigir a expressão de um ou mais transgenes ou genes repórter. Em uma modalidade, um cassete de expressão de genes que compreende o promotor a montante constitutivo pode conduzir a expressão de dois ou mais transgenes ou genes repórter. Em uma outra modalidade, o promotor a montante pode compreender um ítron. Em uma modalidade ,

o promotor a montante pode compreender uma sequência de ítron que está operacionalmente ligada a um gene repórter ou transgene. Em uma outra modalidade o promotor a montante pode compreender um 5'-UTR ou a sequência líder. Em uma modalidade , o promotor a montante pode compreender 5'-UTR ou uma sequência líder que está operacionalmente ligada a um gene repórter ou transgene. Em ainda outra modalidade, o promotor a montante pode compreender um 5'-UTR ou a sequência líder e uma sequência de ítron. Em uma modalidade , o promotor a montante pode compreender um 5'-UTR ou a sequência líder e uma sequência de ítron que está operacionalmente ligada a um gene repórter ou transgene.

[0097] Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II, em que a 5'-UTR ou a sequência líder é, pelo menos, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO : 6. Em uma modalidade, um cassete de expressão que compreende um gene ou líder de um gene do milho que codifica uma ubiquitina-1 de proteína que ligada está de uma forma operativa a um promotor, em que o promotor é um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II, ou um promotor que se origina a partir de uma planta (por exemplo, promotor Zea mays da ubiquitina-1), um vírus (por exemplo, promotor do vírus do mosaico da veia de mandioca), ou uma bactéria (por exemplo, Agrobacterium tumefaciens delta mas) . Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão do gene compreende um Z. mays cv Hi-II 5'-UTR ou a sequência líder de um gene do milho que codifica uma proteína de ubiquitina que está ligada de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, uma água nos transgene de eficiência, um transgene qualidade nutricional, um transgene de liga-

ção ao DNA , um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos.

[0098] Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II, em que a sequência intrônica é, pelo menos, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % , 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO : 8. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um ítron de um gene do milho que codifica uma proteína de ubiquitina-1 que está ligada de uma forma operativa a um promotor, em que o promotor é um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II, ou um promotor que se origina a partir de uma planta (por exemplo, Promotor Zea mays de ubiquitina-1), um vírus (por exemplo, promotor do vírus do mosaico da veia de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, Agrobacterium tumefaciens delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão do gene compreende um ítron de um gene do milho que codifica uma proteína de ubiquitina que ligada está de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, uma regular-nos a eficiência do transgene, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação ao DNA, um transgene de marcador selecionável, ou combinações dos mesmos.

[0099] Em uma modalidade, um vetor pode compreender um cassete de expressão do gene, tal como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial (BAC), um bacteriófago, um vírus, ou um fragmento de polinucleotídeo excisado pelos presentes inventores na transformação direta ou direcionamento de gene, tal como um DNA doador.

[00100] Em uma modalidade, uma célula ou planta compreende um

cassete de expressão do gene, tal como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, uma célula ou planta compreende um vetor que compreende um cassete de expressão de gene tal como descrito neste pedido. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial (BAC), um bacteriófago, ou um vírus. Deste modo, uma célula ou planta que compreende um cassete de expressão do gene é um ou célula transgênica de uma planta transgênica, respectivamente.

[00101] Em uma modalidade, uma planta transgênica pode ser uma planta monocotiledônea ou uma planta dicotiledônea. Uma modalidade de uma planta monocotiledônea transgênica pode ser, mas não está limitado a milho, trigo, arroz, sorgo, aveia, centeio, bananas, cana de açúcar, e milho-miúdo. Uma modalidade de uma planta transgênica dicotiledônea pode ser, mas não está limitada a soja, algodão, girassol, ou canola. Uma modalidade também inclui uma semente transgênica de uma planta transgênica, tal como descrito na presente invenção.

Marcadores selecionáveis

[00102] Vários marcadores selecionáveis, também descritos como genes repórter, podem ser incorporados em um vetor de expressão escolhido para permitir a identificação e seleção das plantas transformadas ("transformantes"). Vários métodos estão disponíveis para confirmar a expressão de marcadores selecionáveis em plantas transformadas, incluindo, por exemplo, sequenciação de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por Southern blotting, hibridação de RNA, os métodos imunológicos para a detecção de uma proteína expressa a partir do vetor, tais como, proteína precipitada que medeia a resistência a fosfinotricina, observação visual ou de outras proteínas, tais como genes repórter que codificam β -glucuronidase (GUS), luciferase, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amare-

la (YFP), DsRed, β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), a fosfatase alcalina, e semelhantes (Vide Sambrook et al, Molecular Cloning : . a Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Nova Iorque, 2001, o conteúdo é incorporado na presente invenção por meio da referência na sua totalidade).

[00103] Os genes marcadores selecionáveis são usados para a seleção de células ou tecidos transformados. Os genes marcadores selecionáveis incluem genes que codificam resistência a antibióticos, tais como aquelas que codificam a neomicina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT), assim como genes que conferem resistência a compostos herbicidas. Os genes de resistência a herbicidas em geral codifica para uma proteína alvo modificada insensível ao herbicida ou de uma enzima que degrada ou desintoxica o herbicida na planta antes de poder atuar. Por exemplo, a resistência ao glifosato foi obtida usando genes que codificam enzimas alvo mutantes, sintase 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSPS). Os genes e mutantes de EPSPS são bem conhecidos, e ainda descritos abaixo. Resistência ao herbicida glufosinato de amônio, bromoxinil, e 2,4-diclorofenoxyacetato (2,4-D) tem sido obtida através de genes bacterianos que codificam pat ou DSM-2, um nitrilase, um DAA-1 ou um gene AAD-12, que desintoxica os respectivos herbicidas.

[00104] Em uma modalidade, os herbicidas podem inibir o ponto ou meristema em crescimento, incluindo a imidazolinona ou sulfonilureia, e genes para resistência / tolerância de aceto-hidroxiácido sintetase (AHAS) e da acetolactato sintase (ALS). Os genes de resistência a glifosato incluem sintase 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSPS) mutante e dgt-28 genes através da introdução de ácidos nucleicos recombinantes e / ou várias formas de mutagênese in vivo de genes EPSPs nativos, os genes aroA e genes de glifosato acetil transferase (GAT), respectivamente. Genes de resistência para outros compostos

de fosfono incluem genes bar das espécies de *Streptomyces*, incluindo *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces viridichromogenes* e ácidos propriônicos piridinóxi ou fenóxi e ciclo-hexonas (genes que codificam o inibidor ACCase). Exemplos de genes que conferem resistência a ciclo-hexanodionas e / ou ácido ariloxifenoxipropanóico (incluindo Haloxifope, diclofope, Fenoxyprop, Fluazifop, Quizalofope) incluem os genes de acetil coenzima A carboxilase (ACCase) - ACC1-S1, S2 e ACC1-ACC1-S3. Em uma modalidade, os herbicidas podem inibir a fotossíntese, incluindo triazina (+ genes psbA e 1s) ou benzonitrila (gene de nitrilase).

[00105] Em uma modalidade, os genes marcadores selecionáveis incluem, mas não estão limitados a genes que codificam: neomicina-fosfotransferase II ; hidratase cianamida ; aspartato quinase ; sintase di-hidrodipicolinato ; descarboxilase de triptofano ; sintase di-hidrodipicolinato e aspartato quinase insensíveis ; gene bar ; descarboxilase de triptofano ; fosfotransferase de neomicina (NEO) ; fosfotransferase higromicina (HPT ou HYG) ; di-hidrofolato redutase (DH-FR) ; fosfinotricina acetiltransferase ; 2,2-ácido dicloropropiônico desalogenase ; aceto-hidroxiácido sintase ; 5-enolpiruvil-chiquimato-fosfato Sintase (aroA) ; haloarilnitrilase ; acetil-coenzima A carboxilase ; di-hidropteroata sintase (sul I) ; e 32 kD fotossistema II polipeptídeo (psbA).

[00106] Uma modalidade inclui também genes que codificam resistência a: cloranfenicol ; metotrexato ; higromicina ; spectinomicina ; bromoxinil ; glifosato ; e fosfinotricina.

[00107] A lista acima de genes marcadores selecionáveis não se destina a ser limitativa. Qualquer gene repórter ou marcador selecionável é englobado por meio da presente invenção.

[00108] Os genes marcadores selecionáveis são sintetizados para expressão óptima na planta. Por exemplo, em uma modalidade, uma

sequência de codificação de um gene foi modificada por códon de optimização para aumentar a expressão em plantas. Um gene marcador selecionável pode ser optimizado para a expressão de uma espécie particular de planta ou, de uma forma alternativa, pode ser modificado para expressão óptima em plantas dicotiledôneas ou monocotiledôneas. Os códons de Planta preferidos podem ser determinados a partir dos códons de maior frequência nas proteínas expressas em maior quantidade na espécie particular da planta de interesse. Em uma modalidade, um gene marcador selecionável é desenhado para ser expresso em plantas a um nível mais elevado resultando em uma maior eficiência de transformação. Os métodos para otimização da planta de genes são bem conhecidos. A orientação que respeita à optimização e fabricação de sequências polinucleotídicas sintéticas podem ser encontradas em, por exemplo, WO2013 / 016546, WO2011 / 146524, WO1997 / 013402, Patente US N ° 6.166.302, e Patent e U.S. No. 5.380.831, incorporada na presente invenção por meio da referência.

Transgenes

[00109] Os métodos e composições descritos podem ser usados para expressar as sequências de genes de polinucleotídeo dentro do genoma da planta. Por conseguinte, os genes que codificam a tolerância à herbicida, resistência a insetos, os nutrientes, os antibióticos, ou moléculas terapêuticas podem ser expressos pelo novo promotor.

[00110] Em uma modalidade, o elemento de regulamentação do promotor constitutivo da presente descrição é combinado ou de uma forma operativa ligado a um ou mais genes que codificam para sequências de polinucleotídeos que conferem resistência ou tolerância ao glifosato, 2, 4-D glufosinato, ou outro herbicida, proporciona resistência a insetos ou seleciona doenças e / ou melhorias nutricionais, melhores características agronômicas, proteínas ou outros produtos úteis na alimentação, alimentos, industrial, farmacêutico ou para outros

usos. Os transgenes podem ser "empilhados" com duas ou mais sequências de ácidos nucleicos de interesse no genoma de uma planta. O empilhamento pode ser conseguido, por exemplo, através de reprodução de plantas convencionais usando dois ou mais casos de transformação, uma planta com um constructo que contém as sequências de interesse, retransformação de uma planta transgênica, ou adição de novas características através da integração homóloga direcionada através da recombinação.

[00111] Tais sequências polinucleotídicas de interesse incluem, mas não estão limitadas aos exemplos apresentados a seguir:

1. Genes ou sequência de codificação (por exemplo, iRNA) que conferem resistência a pragas ou Doença

[00112] (A) Genes de resistência a doenças de Planta. As defesas das plantas são muitas vezes ativadas por meio da interacção específica entre o produto de um gene de resistência a doença (R) na planta e o produto de um gene de avirulência correspondente (AVR) no fungo patogênico. Uma variedade de planta pode ser transformada com o gene resistente clonado para engenharia de plantas que são resistentes aos agentes patogênicos de cepas específicas. Exemplos de tais genes incluem, o gene Cf-9 de tomate para resistência a *Cladosporium fulvum* (Jones et al, 1994, *Science*, 266 : 789), o gene Pto de tomate, que codifica uma proteína-quinase, para resistência a *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Martin et al, 1993 *Science* 262 : 1432), e do gene de *Arabidopsis* RSSP2 para resistência a *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et al, 1994 *celular*. 78 : 1089).

[00113] (B) Uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, um derivado do mesmo, ou um polipeptídeo sintético modelado do mesmo, tal como, uma sequência de nucleotídeos de um gene Bt δ-endotoxina (Geiser et al, 1986 *Gene*. 48 : 109), e um gene de inseticida vegetativo (VIP) (vide , por exemplo, Estruch et al (1996). *Proc Natl Acad Sci* 93 : 5389

a 94). Além disso, as moléculas de DNA que codificam os genes de δ-endotoxina podem ser compradas na American Type Culture Collection (Rockville, Md.), Sob os números de acesso ATCC 40098, 67136, 31995 e 31998.

[00114] (C) Uma lectina, tal como, as sequências nucleotídicas de vários genes de lectina de ligação a manose *Clivia miniata* (Van Damme et al, 1994 *Plant Moles Biol* 24 : 825).

[00115] (D) Uma proteína de ligação, tais como avidina e homólogos de avidina que são úteis como larvicidas contra pragas de insetos. Vide a Patente U.S. N °5.659.026.

[00116] (E) Um inibidor de enzima, por exemplo, um inibidor da protease ou um inibidor da amilase. Exemplos de tais genes incluem um inibidor da proteinase de cisteína de arroz (Abe et al, 1987, *J. Biol Chem* 262 : 16793), um inibidor de proteinase de tabaco I (Huub et al, 1993 *Plant Moles Biol* 21 : 985), e um inibidor de α-amilase (Sumitani et al, 1993 *Biosci Biotech Biochem*. 57 : 1243).

[00117] (F) Um hormônio específico de inseto ou feromonas como um ecdiesteróide e hormônio juvenil de uma variante do mesmo, um respectivo mimético com base, ou um antagonista ou um agonista dos mesmos, tal como a expressão de baculovírus de esterase de hormônio juvenil clonado, um inativador do hormônio juvenil (Hammock et al., 1990 *Nature* 344 : 458).

[00118] (G) Um peptídeo específico de insetos ou neuropeptídeo que, após expressão, perturba a fisiologia da praga afetada (*J. Biol Chem* 269: 9). Exemplos de tais genes incluem um receptor de hormônio de inseto diurético (Regan, 1994), uma alostatina identificada em *Diptoptera punctata* (Pratt, 1989), e específico de inseto, neurotoxinas paralisantes (Patente U.S. No. 5.266.361).

[00119] (H) Um veneno específico de inseto produzido na natureza por uma cobra, uma vespa, etc, tal como um peptídeo insetotóxico de

escorpião (Pang, 1992 Gene 116 : 165).

[00120] (I) Uma enzima responsável por uma hiperacumulação do monoterpeno, um sesquiterpeno, um esteróide, um ácido hidroxâmico, um derivado de fenilpropanóide ou outra molécula não protéica com atividade inseticida.

[00121] (J) Uma enzima envolvida na modificação, incluindo a modificação pós-translacional, de uma molécula biologicamente ativa ; por exemplo, uma enzima glicolítica, uma enzima proteolítica, uma enzima lipolítica, uma nuclease, uma ciclase, uma transaminase, uma esterase, uma hidrolase, uma fosfatase, uma quinase, uma fosforilase, uma polimerase, uma elastase, quitinase e glucanase, seja natural ou sintética. Exemplos de tais genes incluem, um gene calas (PCT publicado WO93 / 02197), as sequências que codificam quitinases (que podem ser obtidas, por exemplo, a partir de ATCC sob os números de acesso 67152) e 3.999.637, ancilóstomo quitinase do tabaco (Kramer et al., 1993 Inseto Molec Biol. 23 : 691), e salsa ubi4-2 gene de poliubiquitina (Kawalleck et al, 1993 Plant Moles Biol 21 : 673).

[00122] (K) Uma molécula que estimula a transdução de sinal. Exemplos de tais moléculas incluem as sequências de nucleotídeos de clones de cDNA de calmodulina de feijão mung (Garrafa et al, 1994 Plant Moles Biol 24 : 757). E uma sequência de nucleotídeos de um clone de cDNA de milho calmodulina (Griess et al, 1994 Plant Physiol 104 : 1467).

[00123] (L) Um peptídeo momento hidrofóbico. Vide a Patente U.S. N °s 5.659.026 e 5.607.914. ; este último ensina p peptídeos antimicrobianos sintéticos que conferem resistência a doenças.

[00124] (M) Um permease da membrana, um canal anterior ou um bloqueador do canal, tal como um análogo de um peptídeo lítico cecropina-β (Jaynes et al., 1993 Plant Sei. 89 : 43) que torna as plantas de tabaco transgênicas resistentes à *Pseudomonas solanacearum*.

[00125] (N) Uma proteína viral invasivo ou um complexo de toxina derivados a partir da mesma. Por exemplo, a acumulação de proteínas de revestimento viral em células de planta transformadas confere resistência à infecção viral e / ou desenvolvimento da doença efetuada pelo vírus a partir do qual o gene da proteína de revestimento é derivado, bem como pelos vírus relacionados. Resistência mediada pela proteína Brasão foi conferida às plantas transformadas contra virus mosaico d alfalfa, vírus do mosaico do pepino, vírus da raia do tabaco, virus X da batata, vírus Y da batata, vírus da gravura do tabaco, vírus de chocalho do tabaco e vírus do mosaico do tabaco. Vide , por exemplo, Beachy et al. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28 : 451.

[00126] (O) Um anticorpo específico para o inseto ou uma imunotoxina derivada a partir dos mesmos. Dessa maneira, um anticorpo direcionado para uma função metabólica crítica no intestino do inseto pode inativar uma enzima afetada, matando o inseto. Por exemplo, Taylor et al. (1994) Abstract # 497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions mostra a inativação enzimática em tabaco transgênico através da produção de fragmentos de anticorpo de cadeia simples.

[00127] (P) Um anticorpo de vírus específico. Vide , por exemplo, Tavladoraki et al. (1993) Nature 266 : 469, que mostra que as plantas transgênicas que expressam os genes de anticorpos recombinantes são protegidas contra o ataque de vírus.

[00128] (Q) Uma proteína de desenvolvimental arrestivo produzida na natureza por um agente patogênico ou um parasita. Dessa maneira , endo α -1,4-D poligalaturonases fúngicas facilitam a libertação de nutrientes de plantas e colonização fúngica por meio da solubilização da parede celular de planta homo- α -1,4-D-galaturonase Bio / Technology 10 (Cordeiro et al., 1992) : 1436. A clonagem e caracterização de um gene que codifica uma proteína de feijão de inibição endopoligalaturo-

nase é descrita por Toubart et al. (1992 Plant J. 2 : 367).

[00129] (R) Uma proteína de desenvolvimento arrestivo produzida na natureza por uma planta, tal como o gene de inativação de ribosoma de cevada, que proporciona uma maior resistência à doença fúngica (Longemann et al., 1992). Bio / Technology 10 : 3305.

[00130] (S) RNA de interferência em que uma molécula de RNA é usada para inibir a expressão de um gene alvo. Uma molécula de RNA, em um exemplo, é parcialmente ou totalmente de filamento duplo, o que desencadeia uma resposta de silenciamento, resultando em clivagem do dsRNA em pequenos RNA interferentes, que são depois incorporados em um complexo alvo que destrói mRNAs homólogos. Vide, por exemplo, incêndios et al, Patente US N ° 6.506.559. ; Graham et al, Patente U.S. No. 6.573.099.

2. Os genes que conferem resistência a um herbicida

[00131] (A) Os genes que codificam a resistência ou tolerância a um herbicida que inibe o ponto de crescimento ou meristema, tal como um imidazalinona, sulfonanilida ou herbicida de sulfonilureia. Os genes exemplares neste código de categoria para acetolactato sintase (ALS) mutante (Lee et al, 1988 EMBOJ. 7 : 1241), também conhecidos como enzima aceto-hidroxiácido sintase (AHAS) (Miki et al, 1990 Theor Appl Genet 80 : 449).

[00132] (B) Um ou mais genes adicionais que codificam resistência ou tolerância ao glifosato conferida pelos genes de EPSP-sintase e mutantes aroA, ou através da inativação metabólica por genes, tais como DGT-28, 2mEPSPS, GAT (glifosato acetiltransferase) ou GOX (oxidase de glifosato) e outros compostos fosfato como glufosinato (genes pat, bar, e dsm-2) e ácidos ariloxifenoxipropiônicos e ciclohexanodionas (genes de codificação do inibidor ACCase). Vide, por exemplo, Patente US N ° 4.940.835, que descreve a sequência de nucleotídeos de uma forma de EPSP que pode conferir resistência ao

glifosato. Uma molécula de DNA que codifica um gene aroA mutante pode ser obtida na instituição ATCC com o Número de Acesso 39256, e a sequência de nucleotídeos do gene mutante é descrita na patente US No. 4.769.061. O Pedido de Patente Europeia N ° 0 333 033 e Patente US No. 4.975.374 descrevem as sequências de nucleotídeos dos genes de glutamina sintetase que conferem resistência a herbicidas, tais como L-fosfinotricina. A sequência de nucleotídeos de um gene fosfinothricinacetil-transferase é fornecida no Pedido de Patente Europeia N ° 0 242 246. De Greef et al. (1989) Bio / Technology 7 : 61 descrevem a produção de plantas transgênicas que expressam os genes quiméricos de barras que codificam para a atividade fosfinotricina acetil transferase. Exemplos de genes de resistência aos ácidos ariloxifenoxipropiônicos e ciclo-hexanodionas, tais como setoxidim e haloxifope, são os genes Accl-S1, Accl- S2 e Accl-S3 descritos por Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83 : 435.

[00133] (C) Os genes que codificam a resistência ou tolerância a um herbicida que inibe a fotossíntese, tais como uma triazina (genes psbA e gs+) e um benzonitrila (gene da nitrilase). Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3 : 169 descrevem a utilização de plasmídeos que codificam os genes psbA mutantes para transformar Chlamydomonas. As sequências de nucleotídeos para os genes de nitrilase são descritas na Patente U.S. No. 4810648, e as moléculas de DNA que contêm estes genes estão disponíveis na ATCC com os números de acesso 53435, 67441 e 67442. A clonagem e expressão de DNA que codifica para uma glutationa-S-transferase é descrita por Hayes et al. (1992) Bio-chem. J. 285 : 173.

[00134] (D) Os genes que codificam a resistência ou tolerância a um herbicida que se liga a dioxigenases hidroxifenilpiruvato (HPPD), enzimas que catalisam a reação em que para-hidroxifenilpiruvato (HPP) é transformada em homogentisato. Isto inclui herbicidas, tais

como isoxazóis (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente US No. 5.424.276), em particular, isoxaflutol, que é um herbicida seletivo do milho, diketonitrilas (EP496630, EP496631), em particular, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃ fenil) propano-1,3-diona e 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂ fenil) propano-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, Patente US No. 5.506.195), em particular a sulcotriona e pirazolinatos. Um gene que produz um excesso de HPPD nas plantas pode proporcionar resistência ou tolerância a esses herbicidas, incluindo, por exemplo, os genes descritos na Patente U.S. Nos. 6.268.549 e 6.245.968 e a Publicação de Pedido de Patente US No. 2003/0066102.

[00135] (E) Os genes que codificam a resistência ou tolerância à herbicidas fenoxiauxínicos, tais como ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e que podem também conferir resistência ou tolerância às herbicidas de arilaxifenoxipropionato (AOPP). Exemplos de tais genes incluem o gene da enzima dioxigenase dependente de -cetoglutarato (aad-1) descrito na patente US No. 7.838.733.

[00136] (F) Os genes que codificam a resistência ou tolerância à herbicidas fenoxiauxínicos, tais como ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e que também podem conferir resistência ou tolerância à herbicidas piridilóxi auxina, tais como fluroxipir ou triclopir. Exemplos de tais genes incluem o gene da enzima dioxigenase dependente de -cetoglutarato (aad-12), descrito no documento WO2007 / 053482 A2.

[00137] (G) Os genes que codificam a resistência ou tolerância a dicamba (vide, por exemplo, Patente U.S. No. de publicação 20030135879).

[00138] (H) Os genes que fornecem resistência ou tolerância à herbicidas que inibem protoporfirinogênio oxidase (PPO) (vide a Patente US No. 5.767.373).

[00139] (I) Os genes proporcionando resistência ou tolerância à herbicidas de triazina (tal como atrazina) e herbicidas derivados de ureia (tal como diuron) que se ligam a proteínas do núcleo dos centros reacionais de fotossistema II centros (PS II) (Vide Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8 (4) : 1237-1245.

3. genes que conferem ou contribuem para um Trato Agregado de Válor

[00140] (A) O metabolismo de ácidos graxos, por exemplo, por transformação de milho ou Brassica com um gene anti-sentido ou estearoil-ACP dessaturase a aumenta o teor de ácido esteárico da planta (Knultzon et al., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 89 : 2624.

[00141] (B) Diminuição do teor de fitase

[00142] (1) Introdução de um gene que codifica fitase, tal como o gene da fitase de *Aspergillus niger* (Van Hartingsveldt et al, 1993 Gene 127 : 87), aumenta a desagregação de fitato, a adição de fosfato mais livre para a planta transformada.

[00143] (2) Um gene pode ser introduzido que reduz o teor de fitato. No milho, este, por exemplo, pode ser conseguido por meio da clonagem e depois reintroduzindo o DNA associado com o único alelo que é responsável por mutantes de milho caracterizados por baixos níveis de ácido fítico (Raboy et al, 1990 Maydica 35 : 383).

[00144] (C) A composição de hidratos de carbono de modificação efetuada, por exemplo, pela transformação de plantas com um gene que codifica para uma enzima que altera o padrão de ramificação de amido. Exemplos de tais enzimas incluem, gene da frutosiltransferase *Streptococcus muco* (Shiroza et al., 1988) J. Bacteriol. 170 : 810, gene levansucrase *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al, 1985 Mol Gen. Genel 200 : 220), α -amilase *Bacillus licheniformis* (Pen et al, 1992 Bio / Technology 10 : . 292), genes da invertase de tomate (Elliot et al, 1993), gene da amilase de cevada (Sogaard et al, 1993, J. Biol Chem 268 :

22480), e enzima de ramificação do amido endosperma de milho II (Fisher et al, 1993 Plant Physiol 102 :10450) .

Transformação

[00145] Os métodos adequados para a transformação de plantas incluem qualquer método em que o DNA pode ser introduzido em uma célula, por exemplo, e sem limitação : eletroporação (vide , por exemplo, Patente US N ° 5.384.253) ; bombardeamento com micro-projétil (vide , por exemplo, Patentes US Nos 5.015.580 ; 5.550.318 ; 5.538.880 ; 6.160.208 ; 6.399.861 ; e 6.403.865) ; Transformação mediada por Agrobacterium (vide , por exemplo, Patentes US Nos 5.635.055 ; 5.824.877 ; 5.591.616 ; 5.981.840 ; e 6.384.301) ; e transformação de protoplastos (vide , por exemplo, Patente US No. 5.508.184). Estes métodos podem ser usados para transformar de forma estável ou transientemente transformar uma planta.

[00146] Um constructo de DNA pode ser introduzido de uma maneira direta no DNA genômico da célula de planta usando as técnicas tais como agitação com fibras de carboneto de silício (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.302.523 e 5.464.765). Os constructos de DNA podem ser introduzidos de uma maneira direta no tecido da planta usando métodos biolíticos, tais como bombardeamento de partículas de DNA (vide, por exemplo, Klein et al, (1987) Nature 327 : 70 a 73). De uma forma alternativa, os constructos de DNA podem ser introduzidas na célula da planta através de transformação de nanopartículas (vide , por exemplo, Patente US No. de publicação 2009 / 0104700, incorporada na presente invenção por meio de referência na sua totalidade).

[00147] Além disso, a transferência de genes pode ser conseguida por meio de bactérias ou vírus não Agrobacterium, tais como Rhizobium sp. NGR234, Sinorhizobium melilati, Mesorhizobium Loti, vírus X da batata, vírus do mosaico de couve-flor, vírus do mosaico da veia de

mandioca, e / ou o vírus do mosaico do tabaco, vide, por exemplo, Chung et al. (2006) Trends Planta Sci. 11 (1) : 1 a 4.

[00148] Através da aplicação de técnicas de transformação, as células de praticamente qualquer espécie de planta podem ser transformadas de forma estável, e estas células podem ser desenvolvidas em plantas transgênicas por meio das técnicas bem conhecidas. Por exemplo, as técnicas que podem ser particularmente úteis no contexto de transformação de algodão encontram-se descritas nas Patentes US Nos 5.846.797. ; 5.159.135 ; 5.004.863 ; e 6.624.344 ; são descritas técnicas para a transformação de plantas de Brassica, em particular, por exemplo, na Patente U.S. No. 5.750.871 ; são descritas técnicas para transformação de soja, por exemplo, na Patente U.S. No. 6.384.301 ; e são descritas técnicas para a transformação de milho, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 7.060.876 e 5.591.616, e Publicação Internacional PCT WO95 / 06722.

[00149] Depois de efetuar a entrega de um ácido nucleico exógeno para uma célula receptora, uma célula transformada é geralmente identificada para posterior cultura e regeneração de plantas. A fim de melhorar a capacidade de identificar transformantes, pode-se desejar usar um gene marcador de seleção com o vetor de transformação usado para gerar o transformante. Em uma modalidade ilustrativa, uma população de células transformadas pode ser avaliada por meio da exposição das células a um agente seletivo, ou agentes, ou as células podem ser pesquisadas quanto a característica do gene marcador desejado.

[00150] As células que sobrevivem à exposição a um agente seletivo, ou as células que foram marcadas positivamente em um ensaio de rastreio, podem ser cultivadas em meios que apoiam a regeneração das plantas. Em uma modalidade, qualquer meio de cultura de tecido de planta apropriado pode ser modificado por meio da inclusão de ou-

tras substâncias, tais como de regulamentação de crescimento. Os tecidos de plantas podem ser mantidos em um meio básico com os de regulamentação de crescimento até que o tecido seja suficiente disponível para iniciar os esforços de regeneração de plantas. De uma forma alternativa, após as rondas de seleção manual repetida, até que a morfologia do tecido seja adequada para a regeneração (por exemplo, pelo menos 2 semanas), o tecido pode então ser transferido para meio conducente à formação de rebentos. As culturas são transferidas periodicamente até que a formação de brotos tenha ocorrido de forma suficiente. Uma vez que os brotos são formados, eles são transferidos para meios propícios para a formação de raízes. Uma vez que as raízes suficientes são formadas, as plantas podem ser transferidas para o solo para um maior crescimento e maturidade.

[00151] Para confirmar a presença de um ácido nucleico pretendido que compreende os constructos previstos na regeneração de plantas, uma variedade de ensaios pode ser realizada. Tais ensaios podem incluir: ensaios biológicos moleculares, tais como Southern e Northern blotting e PCR ; ensaios bioquímicos, tais como a detecção da presença de um produto de proteínas por meios imunológicos, tais como E-LISA, Western blot, e / ou espectrofotometria LC-MS MS) ou por meio das funções enzimáticas, tais como, por parte das plantas, tais como ensaios de folha, calo, ou ensaios de pólen ; e / ou a análise do fenótipo da planta inteira regenerada.

[00152] Acontecimentos transgênicos podem ser rastreados, por exemplo, por meio da amplificação por PCR usando iniciadores oligonucleotídicos específicos para as moléculas de ácido nucleico de interesse. A genotipagem PCR é entendida como incluindo, mas não se limitam a, amplificação por PCR de DNA genômico derivado de isolado e / ou purificado de tecido da planta hospedeira prevista para conter uma molécula de ácido nucleico de interesse integradas no genoma,

seguido de clonagem padrão, e a análise da sequência de produtos de amplificação de PCR. Os métodos de genotipagem por PCR foram bem descritos (vide, por exemplo, Rios et al (2002) Plant J. 32 : 243 a 53) e podem ser aplicados a DNA genômico derivado de qualquer espécie de planta ou tipo de tecido, incluindo as culturas de células.

[00153] As combinações de iniciadores oligonucleotídicos que se ligam tanto a sequência alvo quanto a sequência introduzida podem ser usadas sequencialmente ou multiplexadas em reações de amplificação de PCR. Os iniciadores oligonucleotídicos concebidos para emparelhar com o local alvo, sequências de ácido nucleico introduzidas, e / ou combinações dos dois tipos de sequências de ácidos nucleicos podem ser produzidos. Dessa maneira, as estratégias de genotipagem de PCR podem incluir, por exemplo, e sem limitação : a amplificação de sequências específicas no genoma da planta ; amplificação de múltiplas sequências específicas no genoma da planta ; amplificação de sequências não específicas no genoma da planta ; e combinações de qualquer um dos precedentes. Uma pessoa que é versada na técnica pode conceber combinações de iniciadores adicionais e reações de amplificação para interrogar o genoma. Por exemplo, um conjunto de iniciadores direto e inverso de oligonucleotídeos pode ser desenhado para hibridar com a (s) sequência (s) de ácido nucleico específica (s) para o alvo fora dos limites da sequência de ácido nucleico introduzida.

[00154] Os iniciadores oligonucleotídicos Frente e reverso podem ser concebidos para hibridar especificamente com uma molécula de ácido nucleico introduzido, por exemplo, a uma sequência correspondendo a uma região de codificação dentro de uma sequência de nucleotídeos de interesse aí compreendida, ou outras partes da molécula de ácido nucleico. Os iniciadores podem ser usados em conjunto com os iniciadores descritos na presente invenção. Os iniciadores oligonu-

cleotídicos podem ser sintetizados de acordo com uma sequência desejada e estão comercialmente disponíveis (por exemplo, a partir de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). A amplificação pode ser seguida por meio da clonagem e sequenciação, ou por meio da análise de sequência direta dos produtos de amplificação. Em uma modalidade, os iniciadores oligonucleotídicos específicos para o gene alvo são empregues em amplificações por PCR.

Método de expressar um transgene

[00155] Em uma modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em uma planta compreende o crescimento de uma planta que compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-IIa (SEQ ID NO : 2), operacionalmente ligado a pelo menos um transgene. Em uma modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em células de um tecido de planta ou planta compreende a cultura de uma célula de planta ou tecido de planta que compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-IIa (SEQ ID NO : 2), operacionalmente ligado a pelo menos um transgene.

[00156] Em uma modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em uma planta compreende o crescimento de uma planta que compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-IIa (SEQ ID NO : 2), operacionalmente ligado a pelo menos um transgene. Em uma outra modalidade, um método de expressar pelo menos um transgene em uma célula de planta ou tecido de planta compreende a cultura de um tecido de planta ou célula de planta que compreende um cassete de expressão de genes que compreende uma Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-IIa (SEQ ID NO : 2), operacionalmente ligado a pelo menos um transgene.

[00157] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que com-

preende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-IIa (SEQ ID NO : 2) ligado de uma forma operativa a um transgene. Em que, o Promotor Ubi-1a Z. mays c.v. Hi-II (SEQ ID NO : 2) é compreendido de um promotor a montante, (SEQ ID NO : 4), 5'-UTR (SEQ ID NO : 6), e por um ítron (SEQ ID NO : 8). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1a Z. mays c.v. Hi-II a montante (SEQ ID NO : 4), 5'-UTR (SEQ ID NO : 6), e por um ítron (SEQ ID NO : 8). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1a Z. mays c.v. Hi-II a montante (SEQ ID NO : 4), 5'-UTR (SEQ ID NO : 6), e por um ítron (SEQ ID NO : 8) de um Gene Ubi-1 Z. mays cv Hi-II. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1a Z. mays c.v. Hi-II a montante (SEQ ID NO : 4), 5'-UTR (SEQ ID NO : 6), e por um ítron (SEQ ID NO : 8) de um Gene Ubi-1 Z. mays cv Hi-II.

[00158] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II. Em uma modalidade, um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II pode ser a SEQ ID NO : 2. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um promotor, em que o promotor é pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II que ligado está de uma forma operativa a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compre-

ende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de utilização eficiente da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos.

[00159] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um Promotor Z. mays cv Hi-II Ubi-1 a montante. Em uma modalidade, um Promotor Z. mays cv Hi-II Ubi-1 a montante pode ser a SEQ ID NO : 4. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um promotor a montante ea, em que o promotor a montante, é pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO : 4. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1a Z. mays c.v. Hi-II a montante que está ligado de uma forma operativa a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1a Z. mays c.v. Hi-II a montante que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de utilização eficiente da água, um transgene de qualidade nutricional, uma de ligação ao DNA do transgene, um transgene de marcador selecionável, ou combinações dos mesmos.

[00160] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um Z. mays cv Hi-II Ubi-1 5'-UTR ou sequência

líder. Em uma modalidade, um *Z. mays* c.v. Hi-II Ubi-1 5'-UTR ou a sequência líder pode ser um polinucleotídeo de SEQ ID NO : 6. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende uma 5'-UTR ou sequência líder, em que a 5'-UTR ou a sequência líder é, pelo menos, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO : 6. Em uma modalidade, um cassete de expressão que compreende um gene *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 , 5'-UTR ou sequência líder que está operacionalmente ligada a um promotor, em que o promotor é um promotor da ubiquitina, ou um promotor que se origina a partir de uma planta (por exemplo, Promotor *Zea mays* de ubiquitina-1), um vírus (por exemplo, promotor do vírus do mosaico da veia de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 , 5'-UTR ou sequência líder que ligado está de uma forma operativa a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou uma célula de planta que compreende um cassete de expressão de genes que compreende um *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 , 5'-UTR ou sequência líder que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de eficiência de utilização de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação ao DNA , um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos.

[00161] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um Ubi-1 ítron. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um Ítron *Z.*

mays cv Hi-II Ubi-1. Em uma modalidade, um *Z. mays* c.v. Hi-II Ubi-1 íntron pode ser um polinucleotídeo de SEQ ID NO : 8. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um íntron, em que o íntron é, pelo menos, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, ou 100 % idêntica à SEQ ID NO : 8. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um Íntron *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 que está operacionalmente ligado a um promotor, em que o promotor é um promotor da ubiquitina, ou um promotor que se origina a partir de uma planta (por exemplo, Promotor *Zea mays* de ubiquitina-1) (por exemplo, promotor do vírus do mosaico da veia de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende uma Íntron *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 que ligado está de uma forma operativa a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou uma célula de planta que compreende um cassete de expressão de genes que compreende uma Íntron *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de utilização eficiente da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos.

[00162] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão de genes que compreende um Promotor Ubi-1a *Z. mays* c.v. Hi-II a montante, íntron Ubi-1, e um Ubi-1 5'-UTR que está operacionalmente ligado a um transgene. O Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II, íntron Ubi-1, e Ubi-1 5'-UTR

pode ser de uma forma operativa ligado a diferentes transgenes dentro de um cassete de expressão do gene, quando um cassete de expressão do gene inclui dois ou mais transgenes. Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão do gene compreende um Promotor Ubi-1 Z. mays cv Hi-II que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um água-nos a eficiência do transgene, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos. Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão do gene compreende um Íntron Z. mays cv Hi-II Ubi-1 que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um água-nos a eficiência do transgene, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável, ou as combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um cassete de expressão do gene compreende um Íntron Z. mays cv Hi-II Ubi-1 que está operacionalmente ligado a um promotor, em que o promotor é um promotor da ubiquitina, ou um promotor que se origina a partir de uma planta (por exemplo, Promotor Zea mays de ubiquitina-1) (por exemplo, promotor do vírus do mosaico da veia de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, Agrobacterium tumefaciens delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão do gene compreende um Z. mays cv Hi-II Ubi-1 5'-UTR que está ligado de uma forma operativa a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de tolerância à inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de utilização eficiente da água, um transgene

de qualidade nutricional, transgene um DNA , um transgene de marcador selecionável, ou combinações dos mesmos.

[00163] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um vetor que compreende um elemento de regulação do gene promotor constitutivo, tal como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um vetor que compreende um elemento de regulação do gene promotor constitutivo, tal como descrito na presente invenção, ligado de uma forma operativa a um transgene. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um vetor que compreende um cassete de expressão do gene, tal como descrito na presente invenção. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial (BAC), um bacteriófago, ou um fragmento de vírus.

[00164] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, célula de planta ou, de acordo com os métodos descritos na presente invenção, podem ser monocotiledônea. A planta monocotiledônea, tecido de planta, célula de planta ou pode ser, mas não está limitado a milho, arroz, trigo, cana de açúcar, cevada, centeio, sorgo, orquídeas, bambu, banana, cattails, lírios, aveia, cebola, milho, trigo e triticale . Em uma outra modalidade, uma planta, tecido de planta, célula de planta ou, de acordo com os métodos descritos na presente invenção, podem ser dicotiledôneas. As plantas dicotiledôneas, tecido de planta, ou célula de planta podem ser, mas não estão limitadas a colza, canola, mostarda da Índia, mostarda da Etiópia, soja, girassol e algodão.

[00165] No que diz respeito à produção de plantas geneticamente modificadas, os métodos para a engenharia genética das plantas são bem conhecidos na técnica . Por exemplo, têm sido desenvolvidos vários métodos para a transformação de plantas, incluindo protocolos de transformação biológicos e físicos para plantas dicotiledôneas, assim

como as plantas monocotiledôneas (por exemplo, Goto-Fumiyuki et al, Nature Biotech. 17 : 282 a 286 (1999) ; Miki et al ., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, BR e Thompson, JE Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67 a 88 (1993)). Em adição, os vetores e métodos da cultura in vitro de células de plantas ou para a transformação e regeneração de tecidos de plantas são disponíveis, por exemplo, em Gruber et al., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, BR e Thompson, JE Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89 a 119 (1993).

[00166] Uma pessoa que é versada na técnica reconhecerá que após a sequência exógena ser estavelmente incorporada em plantas transgênicas e confirmada para ser operável, pode ser introduzida em outras plantas por meio do cruzamento sexual. Qualquer de um número de técnicas de reprodução padrão pode ser usado, dependendo da espécie a ser cruzada.

[00167] Uma célula de planta, raiz, folha, calo, pólen, tecido, ou uma planta transformada pode ser identificado e isolado por meio do rastreio de seleção ou o material de planta engenharia para características codificadas por meio dos genes marcadores presentes no DNA transformador. Por exemplo, a seleção pode ser realizada através do crescimento do material de planta de engenharia em um meio contendo uma quantidade inibidora de um antibiótico ou herbicida para o qual o constructo do gene transformado confere resistência. Além disso, as células transformadas também podem ser identificadas por meio do rastreio para a atividade de quaisquer genes marcadores visíveis (por exemplo, genes YFP, GFP, β -glucuronidase, luciferase, B ou C1) que podem estar presentes nos constructos de ácido nucleicos recombinantes. Tais metodologias de rastreio e de seleção são bem conhecidos daquelas pessoas que são versadas na técnica.

[00168] Os métodos físicos e bioquímicos também podem ser usa-

dos para identificar os transformantes de plantas ou células de plantas que contêm constructos de genes inseridos. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a : 1) análise de Southern ou amplificação por PCR para detectar e determinar a estrutura da inserção de DNA recombinante ; 2) transferência de Northern, proteção de RNase S1, extensão de iniciadores, a amplificação ou a transcriptase reversa-PCR para a detecção e análise de transcritos de RNA dos constructos de genes ; 3) ensaios enzimáticos para a detecção de atividade de enzima ou ribozima, onde tais produtos gênicos são codificados por meio do constructo do gene; 4) análise do sequenciamento de próxima geração (NGS) ; ou 5) eletroforese em gel de proteínas, as técnicas de western blot, imunoprecipitação, ou ensaio imunoenzimático de ligação à enzima (ELISA), em que os produtos de constructo de gene são proteínas. Outras técnicas, tais como hibridação in situ, de coloração enzima, e imunocoloração, também podem ser usadas para detectar a presença ou a expressão do constructo recombinante de órgãos e de tecidos de plantas específicas. Os métodos para fazer todos esses ensaios são bem conhecidos por meio daquelas pessoas que são versadas na técnica.

[00169] Efeitos da manipulação genética usando os métodos descritos na presente invenção podem ser observados, por exemplo, transferências de Northern do RNA (por exemplo, mRNA) isolados a partir dos tecidos de interesse. Tipicamente, se o mRNA está presente ou a quantidade de mRNA aumentou, pode ser assumido que o transgene correspondente está a ser expresso. Podem ser usados outros métodos de medição do gene e / ou a atividade do polipeptídeo codificado. Podem ser usados diferentes tipos de ensaios enzimáticos, dependendo do substrato usado e o método de detecção do aumento ou diminuição de um produto da reação ou subproduto. Além disso, os níveis de polipeptídeo expressos podem ser medidos imunoquimica-

mente, empregando ELISA, RIA, EIA, e outros ensaios base de anticorpos bem conhecidos por meio daquelas pessoas que são versadas na técnica, tais como, por meio dos ensaios de detecção de electroforeticas (ou com coloração ou western blotting). Como um exemplo não limitativo, a detecção da AAD-1 (arilaxialcanoato de dioxigenase; vide WO 2005 / 107437) e proteínas PAT (fosfinotricina-N-acetyltransferase) usando um ensaio de ELISA é descrito na patente US No. de publicação que 20090093366 é incorporada na presente invenção por meio da referência na sua totalidade. O transgene pode também ser expresso seletivamente em alguns tipos de tecidos ou de células de planta ou em algumas fases de desenvolvimento. O transgene pode também ser expresso substancialmente em todos os tecidos da planta e ao longo de todo o seu ciclo de vida. No entanto, qualquer modo de expressão combinatória também é aplicável.

[00170] A presente descrição também engloba as sementes de plantas transgênicas descritas acima, em que a semente compreende o gene repórter, transgene, ou a cassete de expressão do gene. O presente relatório descritivo abrange ainda a progênie, os clones, as linhagens celulares, ou células de plantas transgênicas descritas acima, em que a referida descendência, clone, linhagem celular ou célula compreende o gene repórter, transgene, ou o constructo do gene.

[00171] Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência a métodos e modalidades específicos, deve ser entendido que várias modificações e alterações podem ser feitas sem sair do âmbito da presente invenção descrito aqui.

EXEMPLOS

Exemplo 1 : Nova Identificação e isolamento de Promotor

[00172] A nova sequência do promotor do gene Ubi-1 de *Zea mays* cv Hi-II foi amplificada usando reação de polimerase em cadeia (PCR). Os oligonucleotídeos (Tabela 1) usados para amplificar o novo promo-

tor, *Z. mays* cv Hi-II, foram derivados de regiões conservadas da sequência promotora de *Z. mays* cv B73 Ubi-1, que serviu como controle. Um produto de PCR foi obtido a partir de *Z. mays* c.v. Hi-II e foi caracterizado.

[00173] O produto de PCR que compreende o novo promotor foi克lonado em vetores de Topo™ usando o Kit de Clonagem PCR Invitrogen Zero Blunt® TOPO® de acordo com as instruções do fabricante. Um mapa de vetores, mostrando o plasmídeo克lonado que compreende o novo produto de promotor de PCR é fornecido. O plasmídeo pDAB105713 corresponde a *Z. mays* c.v. Hi-II (FIGURA 2).

Tabela 1 : Iniciadores usados para a Amplificação PCR de Novos Promotores Ubi-1

	Seq. ID No :
Iniciador dianteiro : GCTACCGCG- <u>GACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATG</u>	9
Iniciador Reverso : AGTCAGGTACC <u>CTGCA-</u> <u>GAAGTAACACCAAACAAACAG</u>	10
A sequência específica do promotor dos iniciadores PCR é sublinhada. A sequência iniciadora localizada 5' a montante da sequência específica do promotor é uma sequência ligante usada para a clonagem.	

[00174] Após clonagem, o promotor inserido contendo o produto de PCR foi sequenciado usando os métodos conhecidos por meio daquelas pessoas que são versadas na técnica . As sequências de polinucleotídeos do promotor de *Z. mays* cv Hi-II (FIGURA 4) foram computacionalmente alinhadas e analisadas posteriormente por meio da homologia de sequência com a sequência de controle *Z. mays* cv B73 Ubi-1 (FIGURA 3). Os métodos e / ou programas de software Bioinformáticos conhecidos por meio daquelas pessoas que são versadas na técnica, tais como ClustalW ou Sequencher foram usados para realizar a análise de homologia de sequência.

Exemplo 2 : Nova Caracterização do Promotor

Tabela 2 : Homologia da sequência (%) entre o Promotor Z. mays c.v. B73 Ubi-1 e Novo Promotor Ubi-1						
Promo- tor	Total	Promo- tor A	5'-UTR/ líder	ítron	Caixa TATA	Elemento de cho- que térmico
		montan- te				
Z. mays c.v. Hi-II	94.7	93.3	98.8	95.4	100	100

[00175] A análise da sequência de homologia (FIGURAS3 a 7), incluindo o alinhamento de sequência e comparação com a sequência de controle Z. mays cv B73 Ubi-1 (SEQ ID NO. : 1 ; FIGURA 3) descreveu um novo promotor Ubi-1 para posterior caracterização. Observou-se também que a nova sequência do promotor Ubi-1, obtida a partir de Z. mays cv Hi-II (SEQ ID NO : 2 ; FIGURA 4), compreendia as sequências polinucleotídicas de três regiões distintas ; 1) uma região do promotor a montante (SEQ ID NO : 4), 2) 5'-UTR (SEQ ID NO : 6), e 3) ítron (SEQ ID NO : 8). As regiões do promotor e os elementos de promotor específicos de Z. mays cv Hi-II foram analisadas quanto homologia de sequência com a sequência de controle Z. Mays cv. B73 Ubi-1 (FIGURAS 5 a 7). Mais especificamente, o alinhamento da sequência a montante foi realizado para comparar, independentemente, o promotor, 5'-UTR, e regiões intrônicas, bem como os elementos de regulamentação da caixa TATA e Elemento de Choque Térmico (HSE) do promotor Z. mays cv Hi-II para as regiões correspondentes da sequência de controle Z. mays cv B73 Ubi-1 (FIGURAS 5 a 7., Tabela 2).

[00176] A FIGURA 5 mostra o alinhamento de sequências das regiões a montante de promotor do-Z. mays cv Hi-II em comparação com o promotor da região a montante do promotor-Z. mays cv B73 Ubi-1 sequência de controle do promotor. A FIGURA 6 mostra o alinhamento da sequência de 5'-UTR ou a sequência líder do Z. mays cv Hi-II em comparação com o promotor de 5'-UTR ou a sequência líder do Z. mays cv B73 Ubi-1 da sequência de controle do promotor. A FIGURA

7 mostra o alinhamento de sequências das regiões intrônicas da *Z. mays* cv Hi-II em comparação com o promotor de sequência intrônica da sequência de controle do promotor *Z. mays* cv B73 Ubi-1.

[00177] Os elementos promotores obtidos a partir de *Z. mays* cv. Hi-II mostraram 94,7 % de identidade de sequência total (Tabela 2) para a sequência *Z. mays* cv B73 Ubi-1. Caracterização da nova sequência de promotor *Z. mays* cv Hi-II confirmou que a maior parte dos elementos de regulamentação do promotor (isto é, uma caixa TATA ou do elemento de Choque Térmico) tipicamente encontrada em um promotor funcional, também foi altamente conservada dentro das regiões promotoras do núcleo do promotor *Z. mays* cv Hi- II (Tabela 2). Por exemplo, a FIGURA 5 mostra uma caixa TATA altamente conservada (pares de bases 861 a 873 em itálico e sublinhado) que foi identificada e encontrada para ser localizada a cerca de 50 pb 5' a montante do TSS na região do promotor a montante do novo Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II. Da mesma forma, a FIGURA 5 mostra duas sequências sobrepostas de Elemento de Choque Térmico (HSE) (pares de bases 454 a 781 mostrados como sublinhado e 479 a 498 mostrados na dupla sublinhada, respectivamente) foram bastante conservadas no novo Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II analisado neste estudo e foram localizadas aproximadamente 200 pb 5' a montante do TSS.

[00178] Enquanto apenas pequenos níveis de variação foram observados na região 5'-UTR ou a sequência líder do novo Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II que tinha 98,8 % de identidade com a sequência de controle *Z. mays* cv B73 Ubi-1 (FIGURA 6), as zonas de menor conservação da sequência da região do promotor a montante (FIGURA 5) e a região do ítron (FIGURA 7) também foram identificadas. Por exemplo, um elemento de regulação de 10 pb do promotor localizado na região do promotor a montante Ubi-1 *Z. mays* cv Hi-II (90 a 100 pares de bases mostrados sublinhados) não foi conservado (FIGURA 5). Na

verdade, a maior parte da variação da sequência no Promotor *Z. mays* cv Hi-II foi especificamente contribuída por meio das sequências promotoras a montante e ítron, que mostrou apenas 93,3 % e 95,4 % de semelhança de sequências para o promotor *Z. mays* cv B73 Ubi-1 a montante e as regiões ítron, respectivamente (FIGURAS 5 e 7, Tabela 2).

[00179] Além disso, outros motivos de regulação existem na região do promotor *Z. mays* Ubi-1 a montante que se estendem 100-200bp 5' a montante do TSS. Estes motivos ligam os fatores de transcrição que interagem com o complexo de iniciação da transcrição e facilitam a sua montagem, melhoram a sua estabilidade, ou aumentam a eficiência do promotor fazendo assim que a maquinaria transcrional desencadeie (PEREMARTI et al. 2010). Dessa maneira, supressões, substituições, e inadequações dentro desta região de regulação poderiam afetar tanto a força do promotor quanto a especificidade.

Exemplo 3 : Constructo do Vetor usando novos Promotores de Expressão do gene

[00180] A menos que seja indicado de uma outra maneira, as manipulações bioquímicas e biológicas moleculares descritas neste e nos Exemplos subsequentes foram realizadas por meio das metodologias padrão tal como descrito em, por exemplo, Ausubel et al. (1995), e Sambrook et al. (1989), e as suas atualizações. Os constructos usados nas experiências são descritos em maior detalhe abaixo (Tabela 3).

[00181] Os promotores *Z. mays* que compreendem o promotor a montante , 5'-UTR, e regiões intrônicas, como descrito anteriormente, foram extraídos a partir do gene Ubi-1 das espécies *Z. mays* e os produtos de amplificação de PCR foram purificados em gel usando o kit de extração em gel QIAquick ® (Qiagen Carlsbad, CA). A sequência de polinucleotídeo do promotor foi então clonada em um Gateway Entry Vector® (Invitrogen) usando as técnicas de clonagem usuais, co-

nhecidas na técnica. Gateway Entry Vector® resultante que compreende a sequência do promotor Ubi-1 para *Z. mays* cv Hi-II foi confirmada através de digestão de restrição e sequenciamento. A entrada de controle de vetor que compreende a sequência do promotor *Z. mays* cv B73 Ubi-1 também foi clonada em um vetor de entrada Gateway usando as técnicas de clonagem usuais na técnica .

[00182] Em adição às sequências de promotor Ubi-1, o vetor de entrada também compreendeu o gene repórter da proteína fluorescente amarela a partir das espécies *Phialidium* (PhiYFP ; Shagin, AD, (2004) Mol Biol Evol 21 ;: 841-50), com um ítron ST-LS1 incorporado na sequência (Vancanneyt, G., (1990) Mol Gen Genet 220 ; 245 a 50) e a região 3'-UTR do gene *Zea mays* 5 peroxidase (ZmPer5 ; Patente U.S. No. 6.699.984). Os mapas de vetores, mostrando os vetores clonados de entrada que compreendem cada uma das sequências de promotor são fornecidos. O constructo pDAB105742 corresponde ao vetor de entrada de controle que compreende a sequência do promotor *Z. mays* cv B73 Ubi-1. O constructo pDAB105740 corresponde ao vetor de entrada que compreende a sequência do promotor *Z. mays* Ubi-1 Hi-II. Dessa maneira, os vetores de entrada que compreendem os cassetes de expressão de genes que compreende uma Promotor *Z. mays* Ubi-1, o gene PhiYFP, e o 3'-UTR ZmPer5 foram estabelecidos.

[00183] Tal como descrito na Tabela 3, um constructo do vetor de expressão binário, que compreende o gene repórter PhiYFP impulsionado pela nova sequência promotora e terminado pela ZmPer5 3'-UTR, foi construído. A transformação ou os vetores de expressão para a transformação de embriões de milho mediados por *Agrobacterium* foram construídos através da utilização de métodos de clonagem padrão e as reações de recombinação Gateway® empregando um vetor binário de destino padrão, pDAB101917, e os vetores de entrada que compreendem os cassetes de expressão de genes, como descrito a-

cima.

[00184] O vetor binário de destino, pDAB101917, compreendia um gene de tolerância herbicida, fosfinotricina acetiltransferase (PAT ; Wehrmann et al, 1996, *Nature Biotechnology* 14 : 1274 a 1278). No vetor pDAB101917, a expressão do gene PAT estava sob o controle de um Promotor *Z. mays* Ubi-1, 5'-UTR, e ítron. O vetor pDAB101917 também compreendia uma região 3'-UTR do gene da lipase *Z. mays* (ZmLip ; Patente U.S. No. 7.179.902). O ZmLip 3'-UTR foi usado para terminar a transcrição do mRNA PAT. A reação de recombinação Gateway® permitiu a inserção de cada vetor de entrada, que compreende o cassete de expressão do gene (ou seja, um *Z. mays* cv Hi-II ou *Z. mays* cv B73 Promotor Ubi-1, o gene PhiYFP, e o 3'-UTR ZmPer5) para o vetor binário pDAB101917 de destino. Os vetores de entrada foram inseridos no vetor pDAB101917 de destino entre as fronteiras de T-DNA A e B, e a montante do cassete de expressão PAT.

Constructo do Vetor Binário	Constructo do vetor de entrada			Constructo do vetor de destino			FIGURA
	Promotor	Trans-gene	3'-UTR	Promotor	Gene Repórter	3'-UTR	
pDAB105748	<i>Z. mays</i> c.v. B73 Ubi-1	PhiYFP	ZmPer5	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	ZmLip	8
pDAB105746	<i>Z. mays</i> c.v. Hi-II Ubi-1	PhiYFP	ZmPer5	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	ZmLip	9

[00185] Mapas de vetores, mostrando o constructo de expressão binário, pDAB101917, com os cassetes de expressão de genes compreendem um Promotor *Z. mays* Ubi-1, o gene PhiYFP, e 3'-UTR ZmPer5 incorporados, são fornecidos. Constructo de controle, pDAB105748, corresponde ao cassete de expressão de genes que compreende o Promotor Ubi-1 *Z. mays* cv B73 (FIGURA 8). Além disso, o constructo pDAB105746 corresponde ao cassete de expressão

de genes que compreende a sequência do promotor *Z. mays* cv Hi-II Ubi-1 (FIGURA 9).

Exemplo 4 : Transformação de Plantas

[00186] Os constructos de vetores binários, pDAB105748 (*Z. mays* cv B73) e pDAB105746 (*Z. mays* cv Hi-II), foram, cada uma transformados na cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, EHA101, usando as técnicas padrão de transformação conhecidas na técnica . As colônias bacterianas foram isoladas e o plasmídeo binário de DNA foi extraído, purificado, e confirmado através de digestão com enzimas de restrição.

[00187] A transformação de plantas de milho foi feita de acordo com o protocolo descrito em Vega et al, 2008, *Plant Cell Rep* 27 : 297 a 305, que empregue transformação mediada por *Agrobacterium* e o gene da fosfinotricina-acetiltransferase (PAT ; Wehrmann et al, 1996, *Nature Biotechnology* 14 : 127 a 1278) como um marcador selecionável da planta. As culturas *Agrobacterium tumefaciens* que compreendem os constructos de vetores binários (descritos acima) foram usadas para transformar as Plantas *Z. mays* cv Hi-II e produzir a primeira rodada, T0, casos de milho transgênico. Os embriões zigóticos imaturos foram produzidos, preparados, e colhidos 2,5 meses após a transformação.

REIVINDICAÇÕES

1. Cassete de expressão de genes que compreende um promotor de uma forma operativa ligado a um transgene, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende um polinucleotídeo com pelo menos 90 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO : 2.

2. Cassete de expressão do gene de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o promotor hibrida sob condições rigorosas com uma sonda de polinucleotídeo que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % para um complemento de SEQ ID NO : 2.

3. Cassete de expressão do gene de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o transgene operacionalmente ligado codifica um polipeptídeo ou RNA pequeno.

4. Cassete de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o transgene é selecionado a partir do grupo que consiste em um transgene de tolerância a inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de utilização eficiente da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação ao DNA e um transgene de marcador selecionável.

5. Cassete de expressão do gene de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região 3' não traduzida.

6. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o cassete de expressão do gene como definido na reivindicação 1.

7. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o vetor é selecionado de entre o grupo que consiste em um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial, um vírus, e um bacteriófago.

8. Célula transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende o cassete de expressão do gene como definido na reivindicação 1.

9. Célula transgênica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a célula transgênica é uma célula de planta transgênica.

10. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende a célula de planta transgênica como definida na reivindicação 9.

11. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a planta transgênica é uma monocotiledônea ou uma planta dicotiledônea.

12. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a planta monocotiledônea é selecionada a partir do grupo que consiste em uma planta de milho, uma planta de arroz, e uma planta de trigo.

13. Semente transgênica, caracterizada pelo fato de que é selecionada a partir da planta transgênica como definida na reivindicação 10.

14. Célula transgênica, caracterizada pelo fato de que que compreende um polinucleotídeo sintético com pelo menos 90 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO : 2.

15. Célula transgênica de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que polinucleotídeo sintético híbrida sob condições rigorosas com uma sonda de polinucleotídeo que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % para um complemento de SEQ ID NO : 2.

16. Célula transgênica de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a célula transgênica é uma célula de planta transgênica.

17. Célula transgênica de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a célula de planta transgênica é produzida por meio de um método de transformação de plantas.

18. Célula transgênica de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o método de transformação de plantas é selecionado a partir do grupo que consiste em um método de transformação mediado por Agrobacterium, um método de transformação biológico, um método de transformação de carboneto de silício, um método de transformação de protoplastos, e um método de transformação do lipossoma.

19. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende a célula de planta transgênica como definida na reivindicação 14.

20. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a planta transgênica é uma planta monocotiledônea.

21. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que planta monocotiledônea é selecionada a partir do grupo que consiste em uma planta de milho, uma planta de arroz, e uma planta de trigo.

22. Semente transgênica caracterizada pelo fato de que é selecionada a partir da planta transgênica como definida na reivindicação 21.

23. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o cassete de expressão do gene como definido na reivindicação 14.

24. Vetor recombinado de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o vetor é selecionado entre o grupo que consiste em um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial, um vírus, e um bacteriófago.

25. Método para a expressão de uma sequência de codificação heteróloga em uma planta transgênica, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

- a) transformação de uma célula de planta com um cassete de expressão de genes que compreende uma sequência polinucleotídica que compreende a SEQ ID NO : 2 operacionalmente ligada à sequência de codificação heteróloga, que está operacionalmente ligada a uma região não traduzida 3' ;
- b) isolar a célula de planta transformada que compreende o cassete de expressão do gene ;
- c) regeneração da célula de planta transformada em uma planta transgênica; e,
- d) obter a planta transgênica, em que a planta compreende o cassete de expressão do gene que compreende a sequência de polinucleotídeo que compreende a SEQ ID NO : 2.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação heteróloga é selecionada a partir do grupo que consiste em uma sequência que codifica a tolerância à inseticida, uma sequência que codifica a tolerância à herbicidas, uma sequência que codifica a eficiência da utilização de nitrogênio, uma sequência que codifica a eficiência do uso da água, uma sequência que codifica a qualidade nutricional, uma sequência que codifica a ligação ao DNA, e uma sequência que codifica o marcador selecionável.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a transformação de uma célula de planta é um método de transformação de plantas.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o método de transformação de plantas é selecionado a partir do grupo que consiste em um método de transformação

mediado por Agrobacterium, um método de transformação biolística, um método de transformação de carboneto de silício, um método de transformação de protoplastos, e um método de transformação do lipossoma.

29. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a planta transgênica é uma planta transgênica monocotiledônea ou dicotiledônea.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a planta monocotiledônea é selecionada a partir do grupo que consiste em uma planta de milho, uma planta de trigo, e uma planta de arroz.

31. Semente transgênica, caracterizada pelo fato de que é selecionada a partir da planta transgênica como definida na reivindicação 25.

32. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação heteróloga é expressa em um tecido de planta transgênico.

33. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o tecido de planta transgênica é uma planta transgênica da raiz, caule, pólen ou tecido.

34. Método para o isolamento de uma sequência de polinucleotídeo que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com a SEQ ID NO : 2, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

a) identificar a sequência de polinucleotídeo que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com a SEQ ID ;

b) produção de uma pluralidade de sequências de iniciadores oligonucleotídicos, em que as sequências de iniciadores de oligonucleotídeo se ligam à sequência polinucleotídica que compreende

uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com a SEQ ID ;

c) amplificação da sequência polinucleotídica que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com a SEQ ID a partir de uma amostra de DNA com sequências de oligonucleotídeos iniciadores selecionados a partir da pluralidade de sequências de iniciadores de oligonucleotídeos ; e,

d) isolar a sequência de polinucleotídeo que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com a SEQ ID.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a sequência de polinucleotídeo isolado que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com a SEQ ID NO : 2 está ligada de uma forma operativa a um transgene.

36. Método de acordo com a reivindicação 35 caracterizado pelo fato de que o transgene operacionalmente ligado codifica um polipeptídeo ou um pequeno RNA.

37. Sequência de polinucleotídeo purificada que compreende pelo menos 90 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO : 2, caracterizada pelo fato de que a sequência de polinucleotídeo purificado promove a expressão de um transgene.

38. Sequência de polinucleotídeo purificada de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que uma sequência de sonda de polinucleotídeo que compreende uma identidade de sequência de pelo menos 90 % com o complemento de SEQ ID NO : 2 hibrida sob condições rigorosas com a sequência de polinucleotídeo purificado de acordo com a reivindicação 37.

39. Sequência de polinucleotídeo purificada de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que a sequência de polinucleotídeo purificada está ligada de uma forma operativa a um transgene.

40. Transgene operacionalmente ligado como definido na

reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que o transgene operacionalmente ligado codifica um polipeptídeo.

41. Cassete de expressão do gene que compreende a sequência de polinucleotídeo purificada operacionalmente ligada ao transgene como definido na reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que está operacionalmente ligado a uma região 3' não traduzida.

42. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o transgene é selecionado a partir do grupo que consiste em um transgene de tolerância a inseticida, um transgene de tolerância à herbicida, um transgene de eficiência da utilização de nitrogênio, um transgene de utilização eficiente da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação ao DNA e um transgene de marcador selecionável.

43. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o cassete de expressão do gene como definido na reivindicação 41.

44. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o vetor é selecionado de entre o grupo que consiste em um vetor plasmídico, um vetor cosmídico e um vetor BAC.

45. Célula transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de polinucleotídeo purificada como definida na reivindicação 37.

46. Célula transgênica de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que a célula transgênica é uma célula de planta transgênica.

47. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende a célula de planta transgênica como definida na reivindicação 46.

48. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 47,

caracterizada pelo fato de que a planta é uma planta monocotiledônea.

49. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que a planta monocotiledônea é selecionada a partir do grupo que consiste em uma planta de milho, uma planta de trigo, e uma planta de arroz.

50. Semente transgênica, caracterizada pelo fato de que é selecionada a partir da planta transgênica como definida na reivindicação 49.

FIG. 1

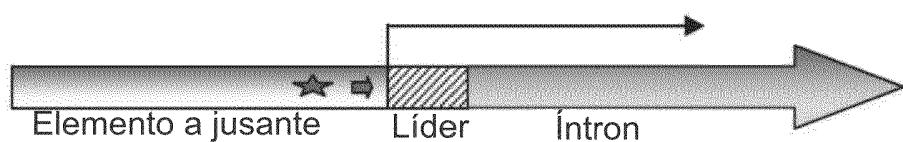


FIG. 2

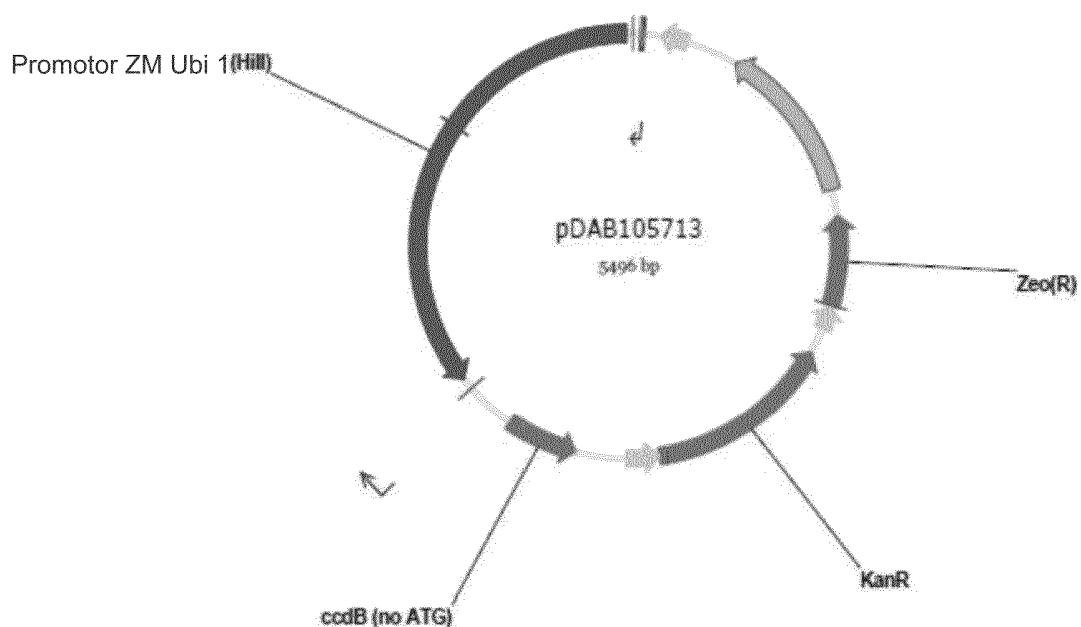


FIG. 3

FIG. 4

FIG. 5

		1	30
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(1)	-----GACCUGGTCTGTGGCCCTCTCT
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(1)	GTGCAGCGTGACCCGGTCTGTGGCCCTCTCT
		31	60
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(22)	AGAGATAAAAGGCAATTGCATGTCATAAGTTA
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(31)	AGAGATAATGAGCAATTGCATGTCATAAGTTA
		61	90
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(52)	TAAAAAAATTACCAAA-ATTTTTT-----
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(61)	TAAAAAAATTACCAAA-TATTTTTTTGTCAC
		91	120
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(74)	-----AAGTGCAGTTAACGTATCTCT
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(91)	ACTTGTGTTGAAGTGCAGTTATCTATCTTT
		121	150
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(95)	ATACATATATTTAAACTTTACTATACGAAT
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(121)	ATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAAT
		151	180
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(125)	AATATAGTTTATATACTAAATAATATCA
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(151)	AATATAATCTATAGTACTACATAATATCA
		181	210
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(155)	GTGTTTTAGAGAATTATATAAAATGAACTGC
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(181)	GTGTTTTAGAGAATCATATAAAATGAAACAGT
		211	240
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(185)	TAGACATGGCTAAATAACAAATTGAGTGT
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(211)	TAGACATGGCTAAAGGACAATTGAGTATT
		241	270
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(215)	TTGACAAACAGGACTCTACAGTTTATCTTT
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(241)	TTGACAAACAGGACTCTACAGTTTATCTTT
		271	300
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(245)	TTAGTGTGCATGTCTCTATTTTTTTTTG
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(271)	TTAGTGTGCATGTCTCTCTTTTTTG
		301	330
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(275)	CAAATAGCTTCACCTATATAAACTTCAC
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(301)	CAAATAGCTTCACCTATATAAACTTCAC
		331	360
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(304)	CAATTATTAGTACATCCATTAGGTTTA
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(331)	CAATTATTAGTACATCCATTAGGTTTA
		361	390
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(334)	GGGTTAATGGTTCTATAGACTAATTTTT
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(361)	GGGTTAATGGTTCTATAGACTAATTTTT
		391	420
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(363)	-ACTACATCTATTTTATTCTATTTTACCC
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(391)	TAGTACATCTATTTTATTCTATTTTACCC
		421	450
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(392)	CTAAATTAGAAGAACTAAACTCTATTTTA
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(421)	CTAAATTAAAGAAAAGTAAACTCTATTTTA
		451	480
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(422)	GTTTTTTTA-----ATAATTAGATATAAA-
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(451)	GTTTTTTTATTAAATAGTTAGATATAAAA
		481	510
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(447)	TAGAATAAAATAAAAGTGACTAAAAATTAAAC
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(481)	TAGAATAAAATAAAAGTGACTAAAAATTAAAC
		511	540
	Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(477)	TAAATACCTTTAATAATAAAAAAA-CTA
	Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(511)	CAAATACCCCTTTAAGAATAAAACTA
		541	570

FIG. 5 cont.

Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(506)	AGGAAACATTTCTTGTTCGAGTAGATA
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(541)	AGGAAACATTTCTTGTTCGAGTAGATA
	571	600
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(536)	ATGACAGGCTGTCAACCCCGTCGACGAGT
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(571)	ATGCCAGCCTGTAAACCCCGTCGACGAGT
	601	630
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(566)	CTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAGC
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(601)	CTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAGC
	631	660
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(596)	GTCGGCTCGGCCAAGCGAACGAGACGGCA
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(631)	GTCGGCTCGGCCAAGCGAACGAGACGGCA
	661	690
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(626)	CGGCATCTCTGTCGCTGCCCTCTGGACCCCT
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(661)	CGGCATCTCTGTCGCTGCCCTCTGGACCCCT
	691	720
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(656)	CTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTG
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(691)	CTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTG
	721	750
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(686)	CTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGG
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(721)	CTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGG
	751	780
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(716)	CGGAGCGGCAGACGTGACCGGGCACGGCAG
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(751)	CGGAGCGGCAGACGTGACCGGGCACGGCAG
	781	810
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(746)	GCGGCCCTCTCCCTCTCACGGCACCGGC
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(781)	GCGGCCCTCTCCCTCTCACGGCACCGGC
	811	840
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(776)	AGCTACGGGGGATTCCCTTCCCCACCGCTCC
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(811)	AGCTACGGGGGATTCCCTTCCCCACCGCTCC
	841	870
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(806)	TTCGCTTCCCTCCTCGCCCGCCGTAATA
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(841)	TTCGCTTCCCTCCTCGCCCGCCGTAATA
	871	896
Zea Mays c.v. Hi-II a jusante	(836)	AATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 a jusante	(871)	AATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT

FIG. 6

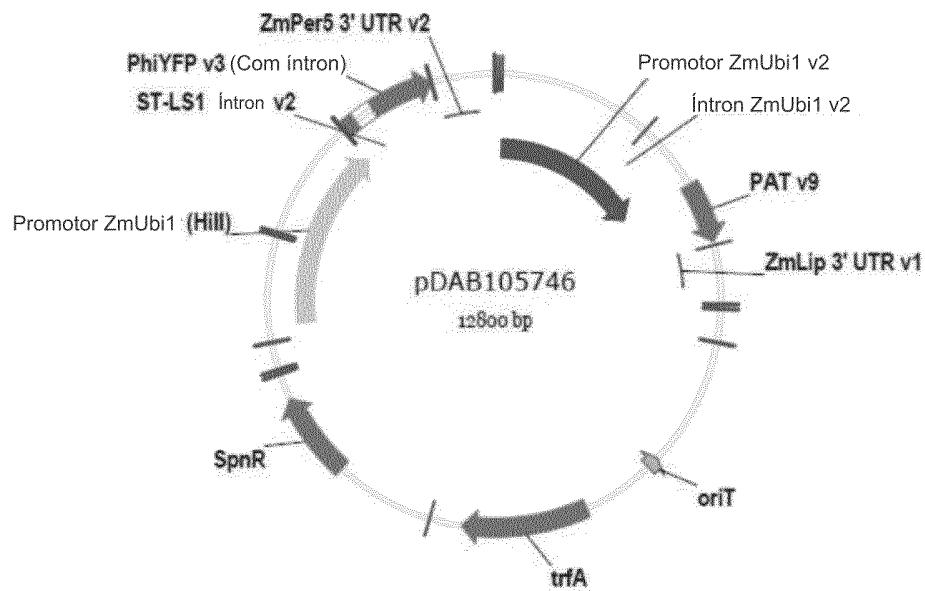
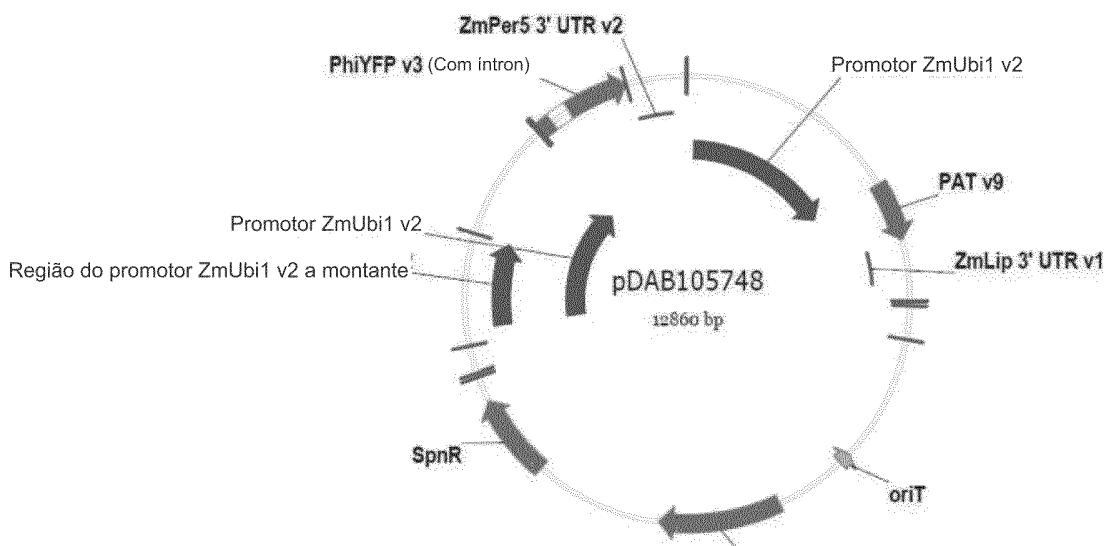
Zea Mays c.v. Hi-II líder	(1)	1	30
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 líder	(1)	TCCCCAACCTCGTGGT	CGTGGAGCGCAC
Zea Mays c.v. Hi-II líder	(31)	31	60
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 líder	(30)	ACACACACAACCAGATCT	CCCCAAATCCA
Zea Mays c.v. Hi-II líder	(61)	61	83
Zea mays c.v. 73 Ubi-1 líder	(60)	CCCGTCGGCACCTCCGTT	CAAG

FIG. 7

Zea mays c.v. Hi-II	Intron	1	GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCCCCCCCC
Zea mays c.v. B73	Intron	(1)	GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCCCC
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	31	CTCTCTCTACCTCTCTAGATCGCGTTC
Zea mays c.v. B73	Intron	(31)	CTCTCTCTACCTCTCTAGATCGCGTTC
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	61	GGTCCATG----GTAGGGCCCGTAGTTC
Zea mays c.v. B73	Intron	(59)	GGTCCATGCTGGTAGGGCCCGTAGTTC
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	91	TACTTCGTTCATGTTGTGTAGATCCGT
Zea mays c.v. B73	Intron	(87)	TACTTCGTTCATGTTGTGTAGATCCGT
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	121	TACTTCGTTCATGTTGTGTAGATCCGT
Zea mays c.v. B73	Intron	(117)	GTTTGTGTTAGATCCGTGCTCTAGCGTTC
Zea mays c.v. B73	Intron	(119)	GTTTGTGTTAGATCCGTGCTCTAGCGTTC
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	151	GTACACGGATGCGACCTGTACATCAGACAT
Zea mays c.v. B73	Intron	(147)	GTACACGGATGCGACCTGTACGTACAGACAC
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	181	GTTCCTGATTGCTAACCTGCCAGTGTTC
Zea mays c.v. B73	Intron	(179)	GTTCCTGATTGCTAACCTGCCAGTGTTC
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	211	TTTGGGAATCCTGGATGGCTCTAGCCGT
Zea mays c.v. B73	Intron	(207)	TTTGGGAATCCTGGATGGCTCTAGCCGT
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	241	TCCGCACACGGGATGGATTTCATGATTTT
Zea mays c.v. B73	Intron	(239)	TCCGCACACGGGATGGATTTCATGATTTT
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	271	TTTGTTCGTTGCATAGGGTTGGTTGCG
Zea mays c.v. B73	Intron	(267)	TTTGTTCGTTGCATAGGGTTGGTTGCG
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	301	CTTTTCCTTATTCAATATATGCCGTGCA
Zea mays c.v. B73	Intron	(299)	CTTTTCCTTATTCAATATATGCCGTGCA
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	331	CTTGTTCGTTGTGGGTCACTTTTCATGTTT
Zea mays c.v. B73	Intron	(327)	CTTGTTCGTTGTGGGTCACTTTTCATGTTT
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	361	TTTTGGCTTGCTGTGATGATGTGGCTG
Zea mays c.v. B73	Intron	(359)	TTTTGGCTTGCTGTGATGATGTGGCTG
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	391	GTGGGGCGCTCGTCTAGATCGGAGTAGAA
Zea mays c.v. B73	Intron	(387)	GTGGGGCGCTCGTCTAGATCGGAGTAGAA
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	421	TACGTGTTCAAACCTACCTGGTGGATTATT
Zea mays c.v. B73	Intron	(419)	TTCTGTGTTCAAACCTACCTGGTGGATTATT
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	451	AAA---GGATCTGTATGTGCCATACA
Zea mays c.v. B73	Intron	(447)	AATTTCGGATCTGTATGTGCGGCCATACA
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	481	TCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGATGGA
Zea mays c.v. B73	Intron	(474)	TATTTCATAGTTACGAAATTGAAGATGATGGA
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	511	TGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACAT
Zea mays c.v. B73	Intron	(504)	TGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACAT
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	540	541
Zea mays c.v. B73	Intron	(509)	570

FIG. 7 cont.

Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(534)	GTTGATGCCGGTTTACTGATGCATATACA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(539)	GTTGATGCCGGTTTACTGATGCATATACA
		571	600
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(564)	GAGATGCTTTTTTTTCCCTTGGTTGTGAT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(569)	GAGATGCTTTTGTT-CGCTTGGTTGTGAT
		601	630
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(594)	GATGCGCTGCGTTGGGCCGTCGTT-----
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(598)	GATGCGCTGCGTTGGGCCGTCGTTCATTC
		631	660
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(620)	---TAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(628)	GTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAA
		661	690
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(646)	ACTAACTGGTGGATTATTAATTTGGATC
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(658)	ACTACCTGGTGTATTTATTAATTTGGAAC
		691	720
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(676)	TGTATGTGTGCCATACATCTTCATAGTT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(688)	TGTATGTGTGTATACATCTTCATAGTT
		721	750
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(706)	ACGAGTTAACGATGATGGATGGAAGTATCG
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(718)	ACGAGTTAACGATG---GATGGAAATATCG
		751	780
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(736)	ATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTTGG
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(745)	ATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTTGG
		781	810
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(766)	TTTACTGATGCATATACATGATGGCATAT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(775)	TTTACTGATGCATATACATGATGGCATAT
		811	840
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(796)	GCAGCATCTATTCAATTCAATGCTCTAAC
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(805)	GCAGCATCTATTCA---TATGCTCTAAC
		841	870
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(826)	TTGAGTACCTATCTATTATAATAAACAAAGT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(831)	TTGAGTACCTATCTATTATAATAAACAAAGT
		871	900
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(856)	ATGTTTATAATTATTTGATCTTGATATA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(861)	ATGTTTATAATTATTTGATCTTGATATA
		901	930
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(886)	CTTGGATGATGGCATATGCCAGCAGCTATAT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(891)	CTTGGATGATGGCATATGCCAGCAGCTATAT
		931	960
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(916)	GIGGATTTTTTAGCTCTGCCCTCATACGC
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(921)	GTGGATTTTTTAGGCCCTGCCCTCATACGC
		961	990
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(946)	TATTTTATTGCTTGGTACTGTTCTTTGT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(951)	TATTTTATTGCTTGGTACTGTTCTTTGT
		991	1020
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(976)	CGATGCTCACCCCTGTTGTTGGTACTT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(981)	CGATGCTCACCCCTGTTGTTGGTACTT
		1021	
Zea mays c.v. Hi-II	Intron	(1006)	CTGCAG
Zea mays c.v. B73 Ubi-1	Intron	(1011)	CTGCA-

FIG. 8**FIG. 9**

RESUMO

Patente de Invenção: "**PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO**".

A presente invenção refere-se ao promotor *Zea mays* c.v. B73 ubiquitina-1 (*Z. mays* cv B73 Ubi-1) que conduzem os níveis elevados de expressão constitutiva do transgene nas plantas. O uso repetido do mesmo promotor *Z. mays* c.v. B73 Ubi-1 nos constructos multi-gene podem também levar ao silenciamento de genes, tornando os produtos transgênicos menos eficazes. São proporcionados elementos promotores de regulamentação de genes, os constructos, e métodos para a expressão de um transgene em células de plantas e / ou tecidos de planta usando os elementos de regulamentação dos genes a partir do promotor Ubi-1 de um diferente genótipo *Z. mays*, *Z. mays* cv Hi-II.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



C8E344F9DA2B3E5F

Campo 2



8BB088B88F68B700

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P210792.txt
- Data de Geração do Código: 29-12-2014
- Hora de Geração do Código: 14:29:31
- Código de Controle:
 - Campo 1: C8E344F9DA2B3E5F
 - Campo 2: 8BB088B88F68B700