

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

(22) Data de pedido: <b>2007.12.06</b>	(73) Titular(es): <b>KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION 2005 RESEARCH PARK CIRCLE, SUITE 105 MANHATTAN, KS 66502-5020</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2006.12.07 US 873529 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.10.17</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2017.08.23 192/2017</b>	(72) Inventor(es): <b>MITCHELL R. TUINSTRAN KASSIM AL-KHATIB</b> <b>US US</b>
	(74) Mandatário: <b>ELSA MARIA BRUNO GUILHERME RUA VICTOR CORDON, Nº 14 - 3º 1249-103 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **SORGO RESISTENTE AOS HERBICIDAS DE SINTASE DE ACETOLACTATO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MOLÉCULAS DE ANTICORPO QUE POSSUEM ESPECIFICIDADE PARA DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE AMBAS IL-17A E IL-17F. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE ÀS UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS DAS MOLÉCULAS DE ANTICORPO E AOS MÉTODOS PARA AS PRODUIR.

**RESUMO**

**"SORGO RESISTENTE AOS HERBICIDAS DE SINTASE DE  
ACETOLACTATO"**

A presente invenção refere-se a moléculas de anticorpo que possuem especificidade para determinantes antigénicos de ambas IL-17A e IL-17F. A presente invenção também se refere às utilizações terapêuticas das moléculas de anticorpo e aos métodos para as produzir.

**DESCRIÇÃO**

**"SORGO RESISTENTE AOS HERBICIDAS DE SINTASE DE  
ACETOLACTATO"**

O presente pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos da América N°. 60/873,529 submetido a 7 de Dezembro de 2006.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona composições e métodos para produzir cultivares de sorgo que são resistentes a herbicidas. Em particular, a presente invenção proporciona plantas de sorgo, tecidos de plantas e sementes de plantas que contêm genes e proteínas alterados de sintase de acetolactato (ALS) que são resistentes à inibição por herbicidas que normalmente inibem a atividade da proteína ALS.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

O sorgo é o segundo mais importante cereal em grão para rações animais cultivado nos Estados Unidos da América. A produção é crítica do ponto de vista económico para as quintas que operam nas áreas marginais de precipitação devido à capacidade do sorgo para tolerar a seca e o calor. Tanto as indústrias do gado como as da

bioenergia utilizam o sorgo como um substrato de energia tornando-a por isso uma cultura versátil.

Mundialmente, o sorgo é o quinto cereal de grão mais importante. Como é tolerante à seca e ao calor, é facilmente o alimento de grão mais vastamente cultivado nas regiões semiáridas de África sub-Saheliana e na região seca peninsular central da Índia. Como tal, o sorgo é utilizado no consumo humano na maior parte das regiões mais secas do mundo tornando-o uma cultura alimentar criticamente importante nestes locais.

O desenvolvimento da resistência a herbicidas em plantas oferece vantagens económicas e de produção significativas, como tal a utilização de herbicidas para controlar ervas daninhas nas culturas tornou-se uma prática quase universal. Todavia, a aplicação desses herbicidas também pode resultar na morte ou crescimento reduzido das plantas da cultura desejada, tornando o momento e o método da aplicação de herbicidas críticos ou em alguns casos inviável.

De particular interesse para os agricultores é a utilização de herbicidas com maior potência, uma eficácia num espectro vasto de ervas-daninhas e rápida degradação do solo. Plantas, tecidos de plantas e sementes com resistência a estes compostos proporcionam uma solução atrativa permitindo que sejam utilizados herbicidas para controlar o crescimento de ervas daninhas, com pequeno

risco de lesão da cultura. Uma dessas classes de herbicidas de largo espectro são aquelas que inibem a atividade da enzima sintase de acetolactato (ALS) numa planta. A sintase de acetolactato é necessária para a produção de aminoácidos essenciais tais como valina, leucina e isoleucina em plantas (esta via bioquímica não está presente em humanos ou outros animais). O sorgo é sensível a muitos herbicidas que inibem a ALS que têm como alvo espécies de monocotiledóneas, tornando o uso destes herbicidas para controlar ervas daninhas de gramíneas quase impossível, na medida em que também inibem o crescimento da planta da cultura.

Os herbicidas da sintase de acetolactato controlam um vasto espectro de infestantes gramíneas e de folha larga a taxas de aplicação muito baixas. Existem atualmente disponíveis mais de 56 herbicidas para ALS diferentes, fabricados a partir de várias formulações de sulfonilureias (SU), imidazolinonas (TMI), triazolopirimidinas (TP) e pirimidiniltiobenzoatos (PTB). Descobriu-se que mutações em algumas plantas de cultura, por exemplo tabaco, milho (Patente US N°. 5,767,361) e soja, conferem resistência ao herbicida de ALS, todavia, até à data, essa descoberta não foi feita no sorgo (para uma revisão, ver Tan *et al.*, 2005, *Pest. Manag. Sci.* 61:246-257). O documento US5853973 revela produtos resistentes a herbicidas concebidos com base na estrutura, especificamente variantes da sintase de aceto-hidroxácido que apresentam resistência a herbicidas de imidazolina.

Devido à importância do sorgo no panorama mundial, o que são necessárias são cultivares de sorgo que são resistentes aos efeitos inibidores dos herbicidas de ALS, permitindo desse modo um maior rendimento da cultura quando esses herbicidas são utilizados para controlar gramíneas infestantes.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São aqui descritas composições e métodos para produzir cultivares de sorgo que são resistentes a herbicidas. Em particular, são aqui descritas plantas de sorgo, tecidos de plantas e sementes de plantas que contêm genes e proteínas alterados de sintase de acetolactato (ALS) que são resistentes a inibição por herbicidas que normalmente inibem a atividade da proteína ALS.

O sorgo cultivado [*sorghum bicolor* (L.) Moench] é sensível a muitos herbicidas que inibem a ALS que têm como alvo espécies de monocotiledóneas, ou gramíneas. Todavia, como aqui descrito descobriu-se que um genótipo de sorgo exibe resistência a herbicidas de ALS. A análise genética identificou diferenças genéticas no germoplasma do sorgo que resultam num fenótipo de resistência ao herbicida ALS.

Formas de realização da presente invenção são definidas nas reivindicações. Em particular, a presente invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácido nucleico que confere

resistência à inibição por um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato, em que a referida sequência compreende:

(i) uma sequência compreendendo The Institute for Genomic Research Transcript Assembly número TA3960\_4558, que possui a sequência

GTGCCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCCTCCGAGACAGCCGCCGCA  
ACCATGGCCACCACCGCCGCCGCGCTGCCGCCGCGCTAGCCGGCGC  
CACTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGGCGCACCTCCTGGCCG  
CACGGCGCGCCCTCGCCGCGCCCATCAGGTGCTCAGCGGGCGCCACCC  
GCCACGCTGACGGTGACGGTCCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGTG  
GGGCCCCACCGATCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTTCGAGGCTC  
TTGAGCGCTGCGGGCGTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCCGGGCGGCGC  
TCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGTTCCCCCGTCATCGCCAAC  
CACCTCTTCCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCCTCTGGCTTC  
GCGCGCTCCTCGGGCCGCGTCCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCC  
GGCGCCACCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTC  
CGTCCCCATGGTCGCCATCACGGGACAGGTTCCGCGGGCGCATGATTG  
GCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTCACCCGCTCC  
ATCACCAAACATAACTACCTGGTCCTCGACGTCGACGACATCCCCCG  
CGTCGTGCAGGAGGCTTTCTTCCTCGCCTCCTCCGGTCGCCCGGGACC  
GGTGCTTGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGC  
CGGTCTGGGACACGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTC  
CCAAGCCTCCTGCGACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTTG  
GTGAATCAAGGCGCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCAT  
CTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTGGAGATGACTGGAATCCCAGTC  
ACA ACTACTCTTATGGGCCTTGGCAATTTCCCTGGCGACGACCCACTG  
TCTCTGCGCATGCTTGGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATTATGCA  
GTGGATAAGGCGGATCTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGAT  
CGTGTGACAGGGAAGATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCTAAGATTGT  
GCACATTGATATTGATCCCGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCAC  
ATGTGTCCATCTGTGCAGACGTTAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAATG  
CTCTTCTGGAAGGAAGCACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCA  
TGGCAAGCTGAGTTGGATCAGCAGAAGAGAGAGTTCCCCCTTGGGTA  
TAAACTTTTGATGACGAGATCCAGCCACAATATGCTATTCAGGTTCT



TGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGC  
AGCACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGG  
CAGTGGTTGTCTTCAGCTGGTCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCG  
GCTGCTGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTATCACTGTTGTTGAC  
ATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTAT  
GATCCGAATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACC  
AGCACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCC  
AATAGAGCACACACATACTTGGGAAACCCAGAGAATGAAAGTGAGA  
TATATCCAGATTTTCGTGACAATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCA  
GTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTCCATGCAGCAATCAAGAAGA  
TGCTTGAGACTCCAGGGCCATACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCACC  
AGGAGCATGTGTTGCCTATGATCCCTAGTGGTGGGGCTTTCAAGGAT  
ATGATCCTGGATGGTGGTGGCAGGACTGTGTATTGATCTAAATTTAG  
CATGCACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACATGCATATGAGCTGGTACAA  
GGGTGATGTGTTATTTATGTGATGTTCTCCTGTGTTCTATCTTTTTGTA  
AGCCGTCAGCTATCTATAGTGTGCTTGTGTTGATGTAAGTCTGTTATGGT  
AATCTTAAGTAGTTTCCTACCTTGTAGTGGTGTAGTCTGTTGTTTCGTG  
CTGGCATAATCTGTCATCAGAGGTCATGTAAGTGCCTTTTGCTACAGAT  
AAATAAGGAAATAAGCATTGCTATGCAGTGGTTCTG

ou uma sequência pelo menos 95% homóloga a esta, e que compreende ainda as substituições de nucleótidos de guanina substituída por adenina na posição 1641 e guanina substituída por timina na posição 1684; ou

(ii) um gene de resistência à sintase de acetolactato como se encontra na ATCC N°. PTA-7999, ou uma sequência pelo menos 95% homóloga a esta que compreende ainda as substituições de nucleótidos de guanina substituída por adenina na posição 1641 de TA3960\_4558 e

guanina substituída por timina na posição 1684 de TA3960\_4558. Preferencialmente, a sequência de aminoácidos codificada compreende a sequência de aminoácidos deduzida de The Institute for Genomic Research Transcript Assembly número TA3960\_4558, que possui a sequência:

MATTAATAAALAGATTAAPKARRRAHLLAARRALAAPIRCSAAPPAT  
LTVTAPPATPLRPWGPTDPRKGADILVEALERCVRDVFAYPPGGASMEI  
HQALTRSPVIANHLFRHEQGEAFAASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNL  
VSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLV  
LDVDDIPRVVQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPVWDTPMSLP  
GYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPVLYVGGGCAASGEELRRFVEM  
TGIPVTTTLMGLGNFPGDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFG  
VRFDDRVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQG  
MNALLEGSTSKKSFDGFSWQAELDQQKREFPLGYKTFDDEIQPQYAIQV  
LDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLP  
AAAGAAVANPGITVVDIDGDGSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQH  
LGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVT  
KKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDIIVPHQEHLVPMIPSGGAFKDMILDGDG  
RTVY

que compreende ainda as substituições de aminoácidos de Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu.

A presente invenção também se refere a um vetor que compreende a molécula de ácido nucleico definida acima ligada operacionalmente a um promotor e ligada operacionalmente a pelo menos uma sequência reguladora.

A presente invenção também se refere a uma célula

compreendendo o vetor definido acima, em que a célula é uma célula vegetal.

A presente invenção também se refere a um vírus de RNA que compreende a molécula de ácido nucleico definida acima.

A presente invenção também se refere a uma parte da planta de sorgo que compreende a molécula de ácido nucleico definida acima. Preferencialmente, a parte da planta de sorgo é uma semente ou tecido vegetal.

A presente invenção também se refere a um método para transformar uma célula vegetal que compreende transformar a referida célula com o vetor definido acima. Preferencialmente, o método compreende ainda o passo de regenerar uma planta transgênica a partir da célula vegetal transformada.

A presente invenção também se refere a um polipéptido codificado pela molécula de ácido nucleico definida acima. Preferencialmente, o polipéptido compreende a sequência de aminoácidos deduzida de The Institute for Genomic Research Transcript Assembly número TA3960\_4558, que possui a sequência apresentada acima, que compreende ainda as substituições de aminoácidos de Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu. Numa forma de realização, a invenção proporciona uma ou mais partes de plantas de sorgo cujo germoplasma compreende uma mutação da invenção que torna a planta

resistente a herbicidas de ALS. São aqui descritas as descendências (e.g., F1, F2, F3, etc.) de um cruzamento da referida planta em que o germoplasma da referida descendência possui a mesma mutação que a planta parental. Por isso, formas de realização da presente invenção proporcionam partes de plantas de sorgo cuja germoplasma contém a mutação da invenção, de modo a que o fenótipo das plantas seja resistência ao herbicida de ALS.

É aqui revelado um híbrido de sorgo em que o referido germoplasma híbrido de sorgo confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato a níveis do referido um ou mais herbicidas que iriam normalmente inibir o crescimento de um híbrido de sorgo. Em algumas formas de realização, o referido um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato são de um grupo que consiste em sulfonilureias, imidazolinonas, trazolopirimidas e pirimidiniltiobenzoatos. Em algumas formas de realização, o referido germoplasma de híbrido de sorgo que confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato compreende mutações no gene de acetolactato como se encontra em ATCC N°. PTA-7999. Em algumas formas de realização, as sementes do referido híbrido de sorgo são revestidas com um herbicida da sintase de acetolactato.

É aqui revelado um método de controlo de infestantes na vizinhança de um híbrido de sorgo como aqui descrito, compreendendo proporcionar um ou mais herbicidas

da sintase de acetolactato, aplicando o referido um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato a um campo contendo um híbrido de sorgo como aqui descrito, e controlando ervas infestantes na vizinhança do referido híbrido de sorgo de modo a que o crescimento das ervas infestantes seja afetado adversamente pela aplicação do referido um ou mais herbicidas e o crescimento do referido híbrido de sorgo não seja afetado adversamente. É aqui revelado que o referido híbrido de sorgo compreende uma ou mais mutações no gene da sintase de acetolactato como encontrado em ATCC N°. PTA-7999.

É aqui revelado um híbrido de sorgo, em que o referido híbrido de sorgo compreende um germoplasma que compreende uma ou mais mutações no gene da sintase de acetolactato de modo a resistência a um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato seja conferida ao referido híbrido. É aqui revelado que o referido híbrido de sorgo seja criado por introgressão do germoplasma de um sorgo que compreende a referida uma ou mais mutações para conferir resistência a um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato. É aqui revelado que o referido híbrido de sorgo é criado por incorporação de um gene heterólogo que compreende uma ou mais mutações para conferir resistência a um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato.

É aqui revelado um método para produzir uma linha de planta de híbrido de sorgo resistente a um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato que compreende

identificar um germoplasma conferindo a referida resistência ao herbicida, em que o referido germoplasma de resistente ao herbicida deriva de uma planta de sorgo resistente ao herbicida, e introduzir o referido germoplasma numa linha da planta de sorgo de elite pela introdução de um gene heterólogo.

É aqui revelado um híbrido de sorgo em que o germoplasma do referido híbrido compreende resistência conferida a um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato e resistência a um ou mais compostos de um ou mais grupos de herbicidas que não são inibidores da sintase de acetolactato.

É aqui revelado um método para identificar linhas de plantas de sorgo resistentes a herbicidas da sintase de acetolactato compreendendo fornecer uma amostra de ácido nucleico a uma planta de sorgo, proporcionando iniciadores de amplificação para amplificar uma região de uma planta de sorgo que corresponde a um gene da sintase de acetolactato presente na referida amostra de ácido nucleico, aplicar os referidos iniciadores de amplificação à referida amostra de ácido nucleico de modo a que a amplificação da referida região do referido gene da sintase de acetolactato ocorra, e identificar plantas de sorgo resistentes a herbicidas da sintase de acetolactato baseadas na presença de uma ou mais mutações que conferem resistência ao herbicida sintase de acetolactato presente na referida amostra de ácido nucleico amplificado.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona sementes de sorgo em que o referido germoplasma das referidas sementes compreende um gene mutante da sintase de acetolactato da presente invenção de modo a que a referida mutação confere resistência à inibição pelos herbicidas da sintase de acetolactato. Em algumas formas de realização, o germoplasma das referidas sementes de sorgo compreende um gene mutante da sintase de acetolactato como se encontra na ATCC N°. PTA-7999. Em algumas formas de realização, o gene mutante da sintase de acetolactato é um fragmento funcional do gene como se encontra na ATCC N°. PTA-7999, de modo a que o fragmento do gene codifica um fragmento da proteína que é suficiente para conferir resistência à inibição por herbicidas da sintase de acetolactato a uma planta de sorgo. Em algumas formas de realização, a presente invenção proporciona partes da planta de sorgo que crescem a partir das referidas sementes.

São aqui reveladas plantas de sorgo híbrido que possuem todas as características fisiológicas e morfológicas da referida planta de sorgo cultivada a partir da referida semente de sorgo. É aqui revelado, a presente invenção proporciona culturas de tecidos e culturas de tecido regeneradas que surgem da referida semente de sorgo ou referida parte da planta de sorgo que compreende uma mutação no referido gene da sintase de acetolactato como se encontra na ATCC N°. PTA-7999.

Em algumas formas de realização, a presente invenção proporciona um gene que é pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo, ou pelo menos 99% homólogo ao gene da resistência ao herbicida de ALS como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 como se encontra no ATCC N°. PTA-7999 e compreende as substituições de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu, por exemplo, como se encontra na SEQ ID NO: 1.

É aqui descrito um método de produzir sementes de sorgo que compreendem cruzar uma planta que compreende um gene mutante da sintase de acetolactato como se encontra em ATCC N°. PTA-7999 com ela própria ou com uma segunda planta de sorgo e recolhendo as referidas sementes do referido cruzamento. São aqui revelados os métodos para produzir as referidas sementes de sorgo que compreendem plantar uma linha de sorgo da semente parental em que a referida linha de sementes parental compreende um germoplasma que confere resistência aos herbicidas da sintase de acetolactato com uma linha de sorgo polinizador parental em que o referido germoplasma da linha da semente do polinizador compreende um germoplasma que confere resistência aos herbicidas da sintase de acetolactato, crescer a referida semente parental e plantas de sorgo polinizadoras em conjunto, permitindo que as referidas plantas da semente parental sejam polinizadas pelas referidas plantas polinizadoras parentais, e recolher as sementes que resultas da referida polinização.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**



A Figura 1 apresenta a dupla mutação de Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu no gene de ALS do sorgo que se descobriu estar associado à resistência ao herbicida de ALS.

### DEFINIÇÕES

Como aqui utilizado, o termo "resistente" e "tolerante" é utilizado para se referir a plantas, por exemplo plantas de sorgo, que são capazes de tolerar condições (e.g., herbicidas tais como herbicidas de ALS) prejudiciais a outras estirpes da mesma espécie.

Como aqui utilizado, o termo "cultivar" é sinónimo com "variedade" e é utilizado para se referir a plantas de culturas que são um grupo de plantas semelhantes que por características estruturais e desempenho podem ser identificadas de outras cultivares dentro da mesma espécie.

Como aqui utilizado, o termo "híbrido" refere-se à descendência ou progenitura de plantas parentais geneticamente distintas ou stock produzidas como resultado de polinização cruzada controlada em oposição a uma semente não-híbrida produzida como resultado de polinização natural.

Como aqui utilizado, o termo "progenitura" refere-se às gerações da planta, em que o ancestral da geração pode ser rastreado até à referida planta.

Como aqui utilizado, o termo "derivado" de uma planta resistente ao herbicida inclui a progenitura dessa planta resistente ao herbicida, assim como qualquer mutante, recombinante, ou derivado geneticamente modificado dessa planta, quer seja da mesma espécie ou de uma espécie diferente, em que a(s) característica(s) de resistência ao herbicida da planta original resistente ao herbicida foi/foram transferida(s) para a planta derivada.

Como aqui utilizado, o termo "tecido vegetal" inclui tecidos diferenciados e indiferenciados de plantas incluindo aqueles presentes nas raízes, rebentos, folhas, pólen, sementes e tumores, assim como células em cultura (e.g., células isoladas, protoplastos, embriões, *callus*, etc.). O tecido vegetal pode ser na planta, em cultura de órgãos, cultura de tecidos, ou cultura de células.

Como aqui utilizado, o termo "parte da planta", como aqui utilizado, refere-se a uma estrutura de plantas ou um tecido vegetal, por exemplo, pólen, um óvulo, um tecido, uma vagem, uma semente, e uma célula. Em algumas formas de realização da presente invenção, as plantas transgênicas são plantas de cultura.

Como aqui utilizados, os termos "geração F" e "geração filial" refere-se a qualquer uma das gerações consecutivas de plantas, células, tecidos ou organismos após um cruzamento biparental. A geração que resulta de um

emparelhamento de um cruzamento biparental (*i.e.* dois pais) é a primeira geração filial (designada como "F1" e "F<sub>1</sub>") em referência a uma semente e a sua planta, embora aquela que resulta do cruzamento de indivíduos da F1 é a segunda geração filial (designada como "F2" ou "F<sub>2</sub>") em referência a uma semente e a sua planta.

Como aqui utilizado, o termo "germoplasma" refere-se a qualquer material genético de plantas que contém unidades funcionais de hereditariedade. O termo "germoplasma de elite" em referência a uma planta refere-se a material hereditário de superioridade genética provada.

Como aqui utilizado, o termo "planta elite" refere-se a qualquer planta que resultou do melhoramento e da seleção para um desempenho agronómico superior. Por exemplo, plantas elite de sorgo aqui referidas incluem, mas não estão limitadas às linhas de sorgo Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645, HP162, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 e Tx643, Bt.

Como aqui utilizado, o termo "traço" ou "fenótipo" refere-se a uma característica observável e/ou mensurável de um organismo. Por exemplo, a presente invenção descreve plantas que são resistentes ao herbicida de ALS.

Como aqui utilizado, o termo "herbicida de ALS", também conhecido como herbicida de AHAS, refere-se a um

herbicida que inibe a atividade da enzima sintase de acetolactato (também conhecida como sintase de aceto-hidroxiácido) numa planta. Exemplos de herbicidas de ALS como aqui descritos incluem, mas não estão limitadas a, sulfonilureias (SU), imidazolinonas (INI), triazolopirimidinas (TI) e pirimidiniltiobenzoatos.

Como aqui utilizado, os termos "marcador" e "marcador de DNA" e "marcador molecular" em referência a um "marcador de seleção" refere-se a um traço fisiológico ou morfológico que pode ser determinado como um marcador para a sua própria seleção ou para seleção de outros traços intimamente ligados a esse marcador. Por exemplo, esse marcador pode ser um gene ou traço que está associado a tolerância ao herbicida incluindo, mas não limitado a, repetição de sequência simples (SSR), polimorfismo de sequência simples (SNP), inserções e/ou deleções genéticas e semelhantes.

Como aqui utilizado, o termo "introgride" e "introgressando" e "introgressão" refere-se a técnicas convencionais (*i.e.* clássicas) de melhoramento por polinização para incorporar material genético externo numa linha de stock de melhoramento. Por exemplo, a presente invenção proporciona plantas de culturas de sorgo que sofreram introgressão com um gene mutante de ALS para tolerância ao herbicida através do cruzamento de duas gerações de plantas.

Como aqui utilizado, o termo "selvagem" quando realizado em referência a um gene refere-se a um gene funcional comum ao longo de uma plantação de plantas. Um gene selvagem funcional é aquele que é mais frequentemente observado numa população e é por isso designado arbitrariamente a forma "normal" ou "selvagem" do gene.

Como aqui utilizados, os termos "modificado" ou "mutante" ou "mutante funcional", quando utilizados em referência a um gene ou a um produto de gene refere-se, respetivamente, a um gene ou a um produto de gene que apresenta modificações em sequência e/ou propriedades funcionais (*i.e.*, características alteradas) quando comparadas com o gene selvagem ou produto de gene. Assim, os termos "modificado" e "mutante", quando utilizados em referência a uma sequência de nucleótidos referem-se a uma sequência de ácidos nucleicos que difere em um ou mais nucleótidos um do outro, normalmente uma sequência de nucleótidos relacionada e o termo "mutante funcional", quando utilizado em referência a um polipéptido codificado pelo referido ácido nucleico "modificado" ou "mutante", refere-se à proteína ou polipéptido que retém atividade. No presente pedido, a proteína mutante ALS, "ou seu mutante funcional" é um gene ALS que retém a sua atividade nativa para criar aminoácidos essenciais. Adicionalmente, uma sequência de nucleótidos "modificada" é interpretada como aquela que se encontra no código genético degenerado conhecido pelos especialistas na arte. Por exemplo, o código genético é degenerado na medida em que existem

muitos casos em que codões diferentes especificam o mesmo aminoácido; um código genético no qual alguns aminoácidos podem, cada um, ser codificado por mais do que um codão. Está contemplado que a presente invenção compreende essa degeneração (e.g., em que um híbrido de sorgo compreende um gene de ALS que é pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo, ou pelo menos 99% homólogo à SEQ ID NO: 1) como encontrado em, por exemplo, o germoplasma do sorgo.

Como aqui utilizado, o termo "heterólogo" quando utilizado em referência a um gene ou ácido nucleico refere-se a um gene que foi manipulado de alguma forma.

Como aqui utilizado, o termo "porção" ou "fragmento funcional" quando utilizado em referência a uma proteína (como num "fragmento de uma dada proteína" ou "um fragmento de proteína") refere-se a fragmentos dessa proteína. Os fragmentos podem variar em tamanho desde quatro resíduos de aminoácidos até à sequência amino inteira menos um aminoácido. Na presente invenção, o fragmento da proteína é preferencialmente funcional de modo a que o fragmento de proteína confere resistência à inibição a herbicidas da sintase de acetolactato para uma dada planta.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona genes Da presente invenção que codificam

proteínas de ALS alteradas. É aqui revelada a utilização de herbicidas que não inibem a enzima ALS em sorgo que contém uma enzima de ALT alterada de modo a reduzir a quantidade de plantas infestantes monocotiledóneas e dicotiledóneas presentes num campo de cultura agrícola, em que as referidas plantas infestantes são sensíveis a herbicidas de ALS.

É aqui revelado um germoplasma resistente a ALS de uma planta de sorgo que resulta de, por exemplo, um cruzamento entre duas plantas parentais, um sorgo selvagem "Tailwind ou Tw" e a linha de planta polinizadora de elite Tx2783, produzindo uma geração F<sub>1</sub>, seguida por dois retrocruzamentos (BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>:F<sub>4</sub>), com a semente resultante a ser depositada sob a ATCC N°: PTA-7999, designada KSU 06MN8419.

É aqui revelado um germoplasma de sorgo que confere resistência à inibição por herbicidas de ALS e também confere resistência a insetos contra o broca das hastes manchada *Chilo partellus* (Girijashankar et al., 2005, *Plant Cell Rep.* 24:513-522). É aqui revelado um híbrido de sorgo cujo germoplasma compreende um gene sintético *cryI Ac* de *Bacillus thuringiensis* (Bt) é sujeito a introgressão numa linha de sorgo cujo germoplasma confere resistência a herbicidas de ALS. Também, a incorporação de resistência ao herbicida de ALS e resistência aos insetos é levada a cabo através de transgênesse de plantas no mesmo híbrido de sorgo. Um especialista na arte reconhecerá as várias técnicas como aqui descrito que são aplicáveis à

incorporação de dois ou mais atributos de resistência no mesmo híbrido de sorgo.

Numa forma de realização, o gene da resistência ao herbicida de ALS como se encontra no sorgo que compreende o germoplasma de ALS KSU 06MN8419 depositado sob ATCC No: PTA-7999 é incorporado nas variedades de sorgo de elite através de melhoramento e seleção de plantas, proporcionando desse modo o desenvolvimento de variedades de culturas resistentes ao herbicida que irão tolerar a utilização de herbicidas que inibem a ALS para o controle de infestantes. Em algumas formas de realização, o gene de resistência ao herbicida ALS é pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo, ou pelo menos 99% homólogo ao gene de resistência ao herbicida ALS como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 e compreende as substituições dos aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu. O desenvolvimento deste traço de resistência a herbicida nas variedades de plantas das culturas acima mencionadas permite a utilização destes herbicidas para controlar infestantes monocotiledóneas e dicotiledóneas que crescem na presença destas culturas. Como aqui revelada, a incorporação do germoplasma de resistência a ALS em linhas de elite é através de introgressão, ou métodos clássicos de melhoramento. Em algumas formas de realização, a incorporação do gene de resistência a ALS da invenção em linhas de elite é feita através da transgênese do gene heterólogo. É aqui revelado um híbrido de sorgo, em que pelo menos um ancestral do referido híbrido de sorgo é derivado do germoplasma



resistente a ALS designado KSU 06MN8419 depositado sob ATCC No: PTA-7999. É aqui revelado um híbrido de sorgo, em que pelo menos um ancestral do referido híbrido de sorgo compreende o gene da sintase de acetolactato que confere resistência a herbicidas de ALS como se encontram no germoplasma designado KSU 06MN8419 depositado sob ATCC No: PTA-7999. Em algumas formas de realização, o gene de resistência ao herbicida de ALS é pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo, ou pelo menos 99% homólogo ao gene de resistência ao herbicida de ALS como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 e compreende as substituições de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu.

Como aqui revelado, o germoplasma da resistência ao herbicida de ALS é sujeito a introgressão numa linha de sorgo de elite utilizando técnicas de melhoramento clássico. Exemplos de métodos de melhoramento clássicos para o sorgo podem ser encontrados em, por exemplo, Sleper e Poehlman, 2006, *Breeding Field Crops, Fifth Edition*, Blackwell Publishing.

Como aqui revelado, o germoplasma da resistência ao herbicida de ALS é sujeito a introgressão numa planta de sorgo que proporciona alimento para consumo humano. Como aqui revelado, o germoplasma da resistência ao herbicida de ALS é sujeito a introgressão em plantas de sorgo que proporcionam ração para animais (e.g., aves de aviário, vacas, suínos, ovelhas, etc). Numa forma de realização, o gene de resistência ao herbicida de ALS da invenção é

introduzido no genoma da planta através de transgênese utilizando vetores e tecnologias conhecidas na arte.

São aqui revelados métodos para controlar infestantes num campo de plantas de cultura de sorgo. Como aqui revelado, controlar as infestantes compreende aplicar um herbicida de ALS às referidas plantas de cultura de sorgo, de modo a que o crescimento das infestantes seja inibido, mas o crescimento das plantas de sorgo não seja afetado adversamente. Em algumas formas de realização, o herbicida de ALS é da família dos herbicidas de sulfonilureia, que compreende um ou mais dos ingredientes ativos amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron-metil, clorimuron-etil, clorosulfuron, cinosulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron-metil, etoxisulfuron, flazasulfuron, flupirsulfuron-metil-sódio, foramsulfuron, halosulfuron-metil, imazolsulfuron, iodosulfuron-metil-sódio, mesosulfuron-metil, metsulfuron-metil, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron-metil, piraxosulfuron-etil, rimsulfuron, sulfometuron-metil, sulfosulfuron, tifensulfuron-metil, triasulfuron, tribenuron-metil, trifloxisulfuron-sódio, triflusulfuron-metil, triofensulfuron, e tritosulfuron. Em algumas formas de realização, o herbicida ALS é da família do herbicida imidazolinona, que compreende um ou mais dos ingredientes ativos imazametabenz-metil, imazamox, imazapic, imizapir, imizaquin, e imzetapir. Em algumas formas de realização, o herbicida ALS da família do herbicida pirimidiniltiobenzoato, compreendendo um ou mais dos

ingredientes ativos bispiribac-sódio, piribenzoxim, piriftalid, piriminobacmetil, e piritiobac-sódio. Em algumas formas de realização, o herbicida de ALS é da família do herbicida triazolopirimidina, que compreende um ou mais dos ingredientes ativos cloransulam-metil, diclusolam, florasulam, flumetsulam, metosulam, e penoxsulam. Em algumas formas de realização, o herbicida de ALS compreende uma combinação de ingredientes ativos de uma ou mais famílias do herbicida de ALS como aqui revelado. Todavia, o presente pedido não está limitado ao herbicida de ALS utilizado, e um especialista na técnica apreciará que estão a ser descobertos novos químicos a qualquer momento que inibem a enzima ALS.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona a utilização de um transgene que compreende um gene heterólogo da presente invenção que codifica uma proteína de ALS mutante para proporcionar o traço agronómico selecionado da resistência ao herbicida de ALS. Numa forma de realização, o transgene compreende um gene de ALS mutante como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 depositado sob ATCC No: PTA-7999. Em algumas formas de realização, o gene ALS é pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo, ou pelo menos 99% homólogo ao gene de ALS mutante como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 e compreende as substituições de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu.

*Striga* normalmente conhecida como vassoura de

bruxa, é um género de parasita nocivo para plantas de gramíneas e culturas de cereais de monocotiledóneas, tais como milho, trigo e sorgo. Uma infestação pesada de *Striga* num campo de plantas de cultura danifica as plantas hospedeiras, provocando tolhendo o crescimento, clorose, murchidão, e por fim a morte da planta hospedeira, especialmente no seu habitat nativo em que a água pode ser escassa. *Striga* é nativa para regiões de pastagens semiáridas e temperadas da África e Ásia, todavia pode florescer fora do seu ambiente natural, e existem infestações atuais em terrenos agrícolas nos Estados Unidos da América. As infestações estão disseminadas em África, por isso a *Striga* é um problema atual para os agricultores nas regiões semi-áridas e sub-sahelianas onde o sorgo é uma cultura alimentar fundamental. A planta parasítica é difícil de erradicar, as suas sementes can ficar dormentes no solo até dez anos antes da germinação.

O sinais biológicos para a germinação da semente de *Striga* incluem ser estimulada por exsudatos radiculares a partir da sua planta hospedeira. As sementes de *Striga* germinam enviando uma estrutura infecciosa para o hospedeiro que se liga à raiz do hospedeiro e invade o sistema vascular do hospedeiro, roubando desse modo do hospedeiro a água, minerais e hidratos de carbono. Assim que é feito o contacto inicial com o hospedeiro, a iniciação do rebento de *Striga* e as raízes adventícias começam, e o roubo da planta hospedeira aumenta. Nas localizações nativas onde a água é escassa, a *Striga* seca

efetivamente a planta hospedeira de minerais e água.

O parasitismo de *Striga* é inibido pelos herbicidas de ALS. A presente invenção não está limitada a um mecanismo particular. Na verdade, não é necessário um entendimento do mecanismo não é necessário para praticar a presente invenção. Não obstante, a infecção de *Striga* das raízes de sorgo é eliminada revestindo sementes de sorgo com herbicidas de ALS antes de plantar. Numa forma de realização, as sementes da invenção compreendem um germoplasma que confere resistência ao herbicida de ALS ao referido híbrido de sorgo são revestidas com um ou mais herbicidas de ALS antes da plantação. Em algumas formas de realização, as sementes revestidas são plantadas em terrenos agrícolas nas quais reside a espécie da planta *Striga* parasítica. Em algumas formas de realização, as plantas de híbrido de sorgo que crescem a partir da referida semente revestida são resistentes a infecção por *Striga*.

É aqui revelado um híbrido de sorgo cujo germoplasma confere resistência a herbicidas de ALS e resistência a um ou mais herbicidas adicionais de um ou mais grupos de herbicidas diferentes. Por exemplo, grupos de herbicidas adicionais utilizados para inibir o crescimento de infestantes, incluem, mas não estão limitadas a, inibidores de síntese de lípidos (e.g., ariloxifenoxipropionatos, ciclo-hexanodeionas, benzofuranos, ácidos cloro-carbônicos, fosforoditioatos,

tiocarbamatos), inibidores de fotossíntese no fotossistema II (e.g., fenil-carbamatos, piridazinonas, triazinas, triazinonas, triazolinonas, uracilos, amidas, ureias, benzotiadiazinonas, nitrilos, fenil-piridinas), inibidores de fotossíntese no fotossistema I (e.g., bipyridílios), inibidores de oxidase de protoporfirinogénio (e.g., difeniléteres, N-fenilftalimidas, oxadiazoles, oxizolidinedionas, fenilpirazoles, pirimidindionas, tiadiazoles), inibidores da biossíntese de carotenóides (e.g., piridazinonas, piridinacarboxamidas, isoxazolidinonas, triazoles), inibidores de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (e.g., calistemonas, isoxazoles, pirazoles, tricetonas), inibidores da sintase de EPSP (e.g., glicinas), inibidores da sintetase de glutamina (e.g., ácidos fosfínicos), inibidores de sintase de di-hidropteroato (e.g., carbamatos), inibidores da montagem de microtúbulos (e.g., benzamidas, ácidos benzóicos, dinitroanilinas, fosforoamidatos, piridinas), inibidores de divisão celular (e.g., acetamidas, cloroacetamidas, oxiacetamidas), inibidores da síntese da parede celular (e.g., nitrilos, triazolocarboxamidas) e inibidores de transporte de auxinas (e.g., ftalamatos, semicarbazonas).

#### Melhoramento Clássico do Sorgo

As culturas de campo têm sido melhoradas classicamente através de técnicas que tiram vantagem dos métodos de polinização das plantas. Uma planta é considerada "auto-polinizadora" se o pólen de uma flor pode

ser transmitido à mesma ou a outra flor, enquanto as plantas são consideradas de "polinização cruzada" se o pólen tem de vir de outra flor numa planta diferente para que a polinização ocorra.

As plantas que são auto-polinizadas e selecionadas ao longo de muitas gerações tornam-se homozigóticas se a maioria, se não todos, os seus loci de genes, produzindo desse modo uma população uniforme da verdadeira descendência do melhoramento. Um cruzamento entre duas plantas homozigóticas de diferentes antecedentes ou duas linhas homozigóticas diferentes irão produzir uma população uniforme de plantas híbridas que serão muito provavelmente heterozigóticas em vários dos seus loci de genes. Um cruzamento de duas plantas que são cada uma heterozigótica em vários loci de genes irão produzir uma geração de plantas híbridas que são geneticamente diferentes e não são uniformes.

As plantas de sorgo são plantas de auto-polinização, mas elas também podem ser melhoradas por polinização cruzada. O desenvolvimento de híbridos de sorgo requer o desenvolvimento de pais polinizadores (restauradores de fertilidade) e cruzamentos endogâmicos de pais de sementes utilizando o sistema restaurador de esterilidade-fertilidade masculina citoplásmica, o cruzamento de pais de sementes e pais polinizadores, e a avaliação dos cruzamentos. Os programas de melhoramento de pedigree combinam traços desejáveis; sendo o traço

desejável no presente pedido a resistência da planta a herbicidas de ALS. Este traço é introduzido no grupo de melhoramento de uma ou mais linhas, de modo a que sejam criadas novas linhas endogâmicas através de cruzamento, seguido por seleção de plantas com o traço desejado, seguido por mais cruzamentos, etc. As novas plantas endogâmicas são cruzadas com outras linhas endogâmicas (e.g., linhas de plantas de elite como aquelas aqui descritas).

O melhoramento de pedigree começa com o cruzamento de dois genótipos, tais como Tailwind e uma linha de sorgo de elite (e.g., sorgo Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645, HP162, Wheatland, Tx3042, OK11, QL41, Tx643 e). Se os dois pais originais não fornecem todas as características desejadas, então podem ser incluídas outras fontes na população do melhoramento. Por exemplo, se é desejado um híbrido para que tanto a resistência ao herbicida de ALS como a resistência a outro herbicida como aqui descrito seja desejável, então as plantas com ambos estes atributos podem ser cruzadas utilizando técnicas clássicas de melhoramento. No método de pedigree, as plantas superiores são auto-polinizadas e selecionadas em gerações sucessivas. Nas gerações seguintes, a condição de heterozigotia dá lugar a linhas homogêneas como resultado da auto-polinização e seleção. Tipicamente, no método do pedigree, são praticadas cinco ou mais gerações de auto-polinização e seleção (e.g., S1, S2, S3, S4, S5, etc.).

O retrocruzamento é utilizado para melhorar uma



linha de plantas. O retrocruzamento transfere um traço específico desejável de uma fonte para outra que não tem esse traço. Isto é alcançado através de, por exemplo, o cruzamento de um dador (por exemplo, Tailwind) com uma linha endogâmica (e.g., Tx2783, uma linha polinizadora de elite como aqui descrito). A descendência deste cruzamento é então retrocruzada (i.e. retrocruzamento) com a linha endogâmica de elite, seguido por seleção na descendência resultante para o traço desejado (e.g., resistência a herbicidas de ALS). Após cinco ou mais gerações do retrocruzamento com seleção para o traço desejado, os descendentes são tipicamente heterozigóticos para o locus (loci) que controla o fenótipo desejado, mas serão como o progenitor de elite para os outros traços genéticos. O último retrocruzamento é tipicamente auto-polinizado de modo a produzir uma descendência de melhoramento pura para o gene a ser transferido.

Nos programas atuais de melhoramento de sorgo introgressivo híbrido, são desenvolvidas novas linhas parentais para serem ou linhas de pais de sementes (e.g., Wheatland, Tx3042, N223, 01MN1589, 03MN954, OK11, QL41 e Tx643) ou linhas de pais de pólen (e.g., Tx430, Tx2737, Tx2783, R45, 00MN7645 e HP 162) dependendo se contêm ou não genes de restauração de fertilidade; as linhas de pais de sementes não possuem genes de restauração de fertilidade e são estéreis masculinos em certos citoplasmas (também conhecidas como plantas de "linha A") e férteis masculinas noutros citoplasmas (também conhecidas como plantas de

"linha B"), enquanto as linhas de pais de pólen não são estéreis masculinas e contêm genes de restauração da fertilidade (também conhecidas como plantas de "linha R"). As linhas de pais de sementes são tipicamente criadas para serem citoplasmicamente estéreis masculinas de modo a que as anteras sejam mínimas a não-existentes nestas plantas necessitando por isso de polinização cruzada. As linhas de pais de sementes apenas produzem semente, e o citoplasma é transmitido apenas através do ovo. O pólen para a polinização cruzada é fornecido através de linhas de pais de pólen que contêm os genes necessários para uma completa restauração da fertilidade no híbrido da F1, e o cruzamento combina com o pai de semente estéril masculino para produzir um único cruzamento híbrido de elevando rendimento com boa qualidade de grão. Exemplos de plantas de linha R e linha B que têm utilidade na presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, aquelas descritas na Tabela 1.

TABELA 1

<b>Pedigree</b>	<b>Nova Fonte</b>	<b>Gen</b>	<b>Comentários</b>
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1903	BC2F5	linha R
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1905	BC2F5	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1916	BC2F5	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1926	BC2F5	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1935	13C2F4	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1936	BC2F4	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1940	BC2F4	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1941	BC2F4	linha R

Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1944	BC2F4	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1945	BC2F4	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1956	BC2F4	linha R
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1981	BC2F3	linha R
Tx2737///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1984	BC2F3	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1987	BC2F3	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1992	BC2F3	linha R
Tx430///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-1995	BC2F3	linha R
R45///R45///Tx2737//90SN7/Tw	MN07-2013	BC2F3	linha R
Tx2783//Tx2783/Tw	MN07-2075	BC2F4	linha R
N223///N223//N223/Tw	MN07-2094	BC2F6	linha B
Wheatland///N223//N223/Tw	MN07-2113	BC2F4	linha B
Wheatland///N223//N223/Tw	MN07-2118	BC2F4	linha B
N223///N223//N223/Tw	MN07-2134	BC2F5	linha B
N223///N223//N223/Tw	MN07-2136	BC2F5	linha B
OK11///OK11///N223//N223/Tw	MN07-2164	BC3F3	linha B
QL41/////QL41/////OK11///N223//N223/Tw	MN07-2198	BC4F3	linha B 75% DPI (QL41)
01MN1589///Wht///N223//N223/Tw	MN07-2230	BC4F3	linha B
01MN1589///Wht///N223//N223/Tw	MN07-2248	BC3F3	linha B
01MN1589///Wht///N223//N223/Tw	MN07-2251	BC3F3	linha B
01MN1589///Wht///N223//N223/Tw	MN07-2254	BC3F3	linha B
03MN954///Wht///N223//N223/Tw	MN07-2261	BC3F3	linha B
Tx3042/////Tx3042/////N223//N223//N223/Tw	MN07-2290	BC4F3	linha B
Tx3042/////Tx3042/////N223//N223//N223/Tw	MN07-2293	BC4F2	linha B
N223///N223//N223/Tw	MN07-2084	BC2F4	linha B
N223///N223//N223/Tw	MN07-2088	BC2F4	linha B

Tipicamente, este sistema de restauração da

esterilidade-fertilidade masculina citoplásmica é realizado para a produção de sementes híbridas através da plantação de blocos de filas de plantas estéreis masculinas (pais de sementes) e blocos de filas de plantas de restauração da fertilidade (pais de pólen), de modo a que as plantas pais de sementes sejam polinizadas pelo vento com pólen da planta pai de pólen. Este processo produz um híbrido de cruzamento único vigoroso que é recolhido e plantado pelo consumidor. As plantas pais de sementes estéreis masculinas também podem ser criadas através de reprodução de melhoramento genético introduzindo genes nucleares estéreis masculinos recessivos numa população particular, todavia o sistema de restauração da esterilidade-fertilidade masculina citoplásmica é tipicamente o sistema utilizado para o melhoramento reprodutivo do sorgo híbrido. Sleper e Poehlman, 2006, *Breeding Field Crops, Fifth Ed.*, Blackwell Publishing proporciona uma boa revisão dos atuais processos de melhoramento do sorgo.

A presente invenção não está limitada às linhas de sorgo parentais de elite listadas, e um especialista na arte reconhecerá que qualquer linha de sorgo de elite será igualmente acessível para as composições e métodos como aqui descritos.

#### Plantas Transgênicas

Os genes heterólogos destinados a expressão em plantas são primeiro montados em vetores de expressão

contendo um gene heterólogo e elementos de controle de transcrição e de tradução apropriados, métodos dos quais são bem conhecidos dos especialistas na arte. Os métodos incluem técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, e recombinação genética *in vivo*. Técnicas exemplares são vastamente descritas na arte (Ver *e.g.*, Sambrook. *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., e Ausubel, F. M. *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.).

Em geral, estes vetores compreendem uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo ligado operacionalmente a um promotor e outras sequências reguladoras (*e.g.*, intensificadores, sinais de poliadenilação, etc.) necessários para a expressão numa planta.

Os promotores incluem, mas não estão limitadas a, promotores constitutivos, promotores específicos para o desenvolvimento de tecidos e órgãos, e promotores induzíveis. Exemplos de promotores incluem, mas não estão limitadas a; promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor; um promotor induzível por uma lesão, de tomate, leucina amino peptidase (Chao *et al.*, 1999, *Plant Physiol* 120:979-992, aqui incorporado por referência na sua totalidade); um promotor induzível quimicamente, do tabaco, Relacionado com Patogénese 1 (induzido por ácido salicílico e éster do S- metil do ácido benzotiadiazole-7-

carbatióico); um promotor de choque térmico (Patente U.S. N°. 5,187,267; um promotor induzível pela tetraciclina (Patente U.S. N°. 5,057,422); e promotores específicos para a semente.

As cassetes de expressão podem ainda compreender quaisquer sequências necessárias para expressão de mRNA. Essas sequências incluem, mas não estão limitadas a terminadores de transcrição, intensificadores tais como intrões, sequências virais, e sequências destinadas a direccionar o produto de gene para organitos e compartimentos celulares específicos.

Estão disponíveis vários terminadores de transcrição para utilização na expressão de sequências utilizando promotores tais como aqueles aqui revelados. Os terminadores de transcrição são responsáveis pela terminação da transcrição para além do transcrito e a sua poliadenilação correta. Terminadores de transcrição apropriados e aqueles que são conhecidos por funcionarem em plantas incluem, mas não estão limitadas a, o terminador 35S do CaMV, o terminador tml, o terminador rbcS E9 da ervilha, e o terminador da sintase de nopalina e octopina (Odell *et al.*, 1985, *Nature* 313:810; Rosenberg *et al.*, 1987, *Gene*, 56:125; Guerineau *et al.*, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 262:141; Proudfoot, 1991, *Cell*, 64:671; Sanfacon *et al.*, 1990, *Genes Dev.* 5:141; Mogen *et al.*, 1990, *Plant Cell*, 2:1261; Munroe *et al.*, 1990, *Gene*, 91:151; Ballas *et al.*, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:7891; Joshi *et al.*, 1987,

*Nucleic Acids Res.*, 15:9627.

Em algumas formas de realização, as construções para a expressão do gene heterólogo de interesse incluem uma ou mais das sequências que se verifica aumentarem a expressão genética a partir do interior da unidade de transcrição. Estas sequências podem ser utilizadas em conjunção com as sequências de ácidos nucleicos de interesse para aumentar a expressão em plantas. Verificou-se que várias sequências de intrões aumentam a expressão, particularmente em células de monocotiledóneas. As sequências de intrão foram incorporadas de rotina em vetores de transformação de plantas, tipicamente dentro das sequências líder não-traduzidas.

Em algumas formas de realização, uma construção para a expressão da sequência heteróloga de ácidos nucleicos de interesse também inclui um regulador tal como um sinal de localização nuclear (Kalderon *et al.*, 1984, *Cell* 39:499; Lassner *et al.*, 1991, *Plant Molecular Biology* 17:229), uma sequência de consenso de tradução vegetal (Joshi, 1987, *Nucleic Acids Research* 15:6643), um intrão (Luehrsen e Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225:81), e semelhantes, ligados operacionalmente à sequência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo.

Na preparação da construção que compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo, ou codifica uma sequência concebida para

diminuir a expressão do gene heterólogo, podem ser manipulados vários fragmentos de DNA de modo a proporcionar sequências de DNA na orientação desejada (e.g., de sentido ou anti-sentido) e, como apropriado, na grelha de leitura desejada. Por exemplo, podem ser empregues adaptadores ou ligantes para unir os fragmentos de DNA, ou podem ser utilizadas outras manipulações para proporcionar sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, e semelhantes. Para este efeito, é preferencialmente empregue mutagénese *in vitro*, reparação por iniciadores, restrição, emparelhamento, resseção, ligação, e semelhantes, em que estão envolvidas inserções, deleções ou substituições (e.g., transições e transversões).

Estão disponíveis numerosos vetores de transformação para transformação de plantas. A seleção de um vetor para utilização irá depender da técnica de transformação preferida e da espécie alvo para a transformação. Para certas espécies alvo, são preferidos diferentes marcadores de seleção de antibiótico ou herbicida. Os marcadores de seleção utilizados de rotina na transformação incluem o gene *nptII* que confere resistência à canamicina e antibióticos relacionados (Messing e Vierra, 1982, *Gene* 19: 259; Bevan *et al.*, 1983, *Nature* 304:184), o gene *bar* que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White *et al.*, 1990. *Nucl Acids Res.* 18:1062; Spencer *et al.*, 1990. *Theor. Appl. Genet.* 79:625), o gene *hph* que confere resistência ao antibiótico



higromicina (Blochlinger e Diggelmann, 1984, *Mol. Cell. Biol.* 4:2929), e o gene dhfr que confere resistência ao metotrexato (Bourouis et al., 1983, *EMBO J.*, 2:1099).

Em algumas formas de realização, o vetor plasmídico Ti (T-DNA) está adaptado para utilização num processo de transfeção mediado por *Agrobacterium* tal como na Patente US 6,369,298 (sorgo), e nas Patentes US 5,981,839, 6,051,757, 5,981,840, 5,824,877 e 4,940,838. A construção de plasmídeos Ti e Ri recombinantes em geral segue os métodos tipicamente utilizados com vetores mais comuns, tais como o pBR322. A utilização adicional pode ser feita de elementos genéticos acessórios por vezes encontrados com os plasmídeos nativos e por vezes construídos a partir de sequências estranhas. Estes podem incluir, mas não estão limitadas a, genes estruturais para resistência a antibióticos como genes de seleção.

Existem dois sistemas de vetor plasmídico recombinante, Ti e Ri, actualmente em uso. O primeiro sistema é designado sistema "co-integrado". Neste sistema, o vetor vaivém contendo o gene de interesse é inserido por recombinação genética num plasmídeo Ti não-oncogénico que contém os elementos de atuação cis e de atuação trans necessários para transformação de plantas como, por exemplo, no vetor vaivém pMLJ1 e o plasmídeo não-oncogénico Ti pGV3850. A utilização de TDNA como uma região flanqueadora numa construção para integração num plasmídeo Ti- ou Ri- foi descrita na EPO No. 116,718 e Pedidos PCT

Nºs. WO 84/02913, 02919 e 02920; Herrera-Estrella, 1983, *Nature* 303:209-213; Fraley *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA 80:4803-4807; Horsch *et al.*, 1984, *Science* 223:496-498; e DeBlock *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3:1681-1689.

O segundo sistema é designado o sistema "binário" no qual são utilizados dois plasmídeos e o gene de interesse é inserido num vetor vaivém contendo os elementos de atuação cis necessários para a transformação da planta. As outras funções necessárias são proporcionadas em trans pelo plasmídeo Ti não oncogénico como exemplificado pelo vetor vaivém pBIN19 e o plasmídeo Ti não oncogénico PAL4404. Alguns desses vetores estão disponíveis comercialmente.

Em algumas formas de realização, a sequência de ácidos nucleico de interesse é dirigida a um locus particular no genoma da planta. A integração da sequência de ácidos nucleico de interesse dirigida a um sítio no genoma da célula vegetal pode ser alcançada através de, por exemplo, recombinação homóloga utilizando sequências derivadas de *Agrobacterium*. De um modo geral, as células vegetais são incubadas com um estirpe de *Agrobacterium* que contém um vetor alvo no qual as sequências que são homólogas a uma sequência de DNA dentro do locus alvo são flanqueadas por sequências de DNA de transferência de *Agrobacterium* (T-DNA), como previamente descrito (Patente U.S. Nº. 5,501,967). Um especialista na arte sabe que a recombinação homóloga pode ser alcançada utilizando vetores

de direcionamento que contêm sequências que são homólogas a qualquer parte do gene da planta alvo, quer pertença aos elementos de regulação do gene ou às regiões codificantes do gene. A recombinação homóloga pode ser conseguida em qualquer região do gene de uma planta desde que a sequência de ácidos nucleicos das regiões que flanqueiam o sítio considerado alvo sejam conhecidas. *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria do solo comum que provoca a doença de crista de galo transferindo algum do seu DNA para a planta hospedeira. O DNA transferido (T-DNA) é integrado de forma estável no genoma da planta, em que a sua expressão conduz à síntese de hormonas vegetais e depois ao crescimento tumoral das células. Um complexo macromolecular putativo forma-se no processo de transferência de T-DNA para fora da célula bacteriana para a célula vegetal.

Em algumas formas de realização, os ácidos nucleicos como aqui revelado são utilizados para construir vetores derivados de vírus de TNA (+) da planta (e.g., vírus do mosaico de brome, vírus do mosaico do tabaco, vírus do mosaico da alfafa, vírus do mosaico do pepino, vírus do mosaico do tomate, e suas combinações e seus híbridos). De um modo geral, o polinucleótido heterólogo inserido pode ser expresso a partir destes vetores como a proteína de fusão (e.g., proteína de fusão da proteína de revestimento) ou do seu próprio promotor subgenómico ou outro promotor. Métodos para a construção e utilização desses vírus são descritos nas Patentes U.S. N°s. 5,846,795; 5,500,360; 5,173,410; 5,965,794; 5,977,438; e

5,866,785.

Em algumas formas de realização, uma sequência heteróloga de ácidos nucleicos de interesse que compreende um transgene de ALS mutante como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 depositado sob ATCC No: PTA-7999 é introduzida diretamente numa planta. Em algumas formas de realização, o transgene de ALS mutante é pelo menos 95% homólogo, pelo menos 97% homólogo, ou pelo menos 99% homólogo ao gene de resistência ao herbicida de ALS como se encontra no germoplasma KSU 06MN8419 e compreende as substituições de aminoácidos Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu. Um vetor útil para as técnicas de transferência direta do gene em combinação com a seleção pelo herbicida Basta (ou fosfinotricina) é uma versão modificada do plasmídeo pCIB246, com um promotor 35S do CaMV em fusão operacional com o gene GUS de *E. coli* e o terminador de transcrição 35S de CaMV (WO 93/07278).

Assim que a sequência de ácidos nucleicos que codifica o gene heterólogo esteja ligado operacionalmente a um promotor apropriado e inserido num vetor adequado para a técnica de transformação particular utilizada (e.g., um dos vetores descrito acima), O DNA recombinante descrito acima pode ser introduzido na célula vegetal por várias maneiras conhecidas na arte. Os especialistas na arte irão apreciar que a escolha do método depende do tipo de planta destinada a transformação. Em algumas formas de realização, o vetor é mantido epissomicamente. Em algumas formas de realização, o vetor é integrado no genoma. Em algumas formas de

realização, a transformação direta no genoma do plastídio é utilizada para introduzir o vetor na célula vegetal (por exemplo, ver Patentes U.S. N°s. 5,451,513; 5,545,817; 5,545,818; Pedido PCT WO 95/16783).

A técnica básica para a transformação de cloroplastos envolve a introdução de regiões de DNA plastidial clonado que flanqueia um marcador de seleção juntamente com o ácido nucleico que codifica as sequências de interesse num tecido alvo adequado (e.g., utilizando biolística ou transformação de protoplastos com cloreto de cálcio ou PEG). As regiões flanqueadoras de 1 até 1,5 kb, designadas sequências alvo, facilitam a recombinação homóloga com o genoma plastidial e desse modo permite a substituição ou modificação de regiões específicas do plastoma. Inicialmente, são utilizadas mutações pontuais nos genes cloroplastidiais 16S rRNA e rps 12 que conferem resistência à espectinomicina e/ou estreptomicina como marcadores de seleção para transformação (Svab *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:8526; Staub e Maliga, 1992, *Plant Cell*, 4:39). A presença de sítios de clonagem entre esses marcadores permitem a criação de um vetor de direcionamento plastidial para a introdução de moléculas de DNA estranho (Staub e Maliga, 1993, *EMBO J.*, 12:601). São obtidos aumentos substanciais na frequência de transformação por substituição dos genes de resistência aos antibióticos recessivos de rRNA ou proteína r com um marcador de seleção dominante, codificando o gene *aadA* bacteriano a enzima desintoxicante da espectinomicina

aminoglicósido-3'-adeniltransferase (Svab e Maliga, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:913). Outros marcadores de seleção úteis para a transformação plastidial são conhecidos na arte e estão abrangidos dentro do âmbito da presente invenção. São obtidas plantas homoplásmicas para genomas plastidiais contendo as duas sequências de ácido nucleico separadas por um promotor da presente invenção, e são preferencialmente capazes de expressão elevada de RNAs codificados pela molécula de DNA.

Numa forma de realização, vetores úteis na prática da presente invenção são microinjetadas diretamente nas células vegetais (Crossway, 1985, *Mol. Gen. Genet.*, 202:179). Em algumas formas de realização, o vetor é transferido para a célula vegetal utilizando polietilenoglicol (Krens *et al.*, 1982, *Nature*, 296:72; Crossway *et al.*, 1986, *BioTechniques*, 4:320); fusão de protoplastos com outras entidades tais como minicélulas, células, lisossomas ou outros corpos de superfície com lípidos de fusão (Fraley *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 79:1859); e transformação de protoplastos (EP 0 292 435); transferência direta de genes (Paszkowski *et al.*, 1984, *EMBO J.*, 3:2717; Hayashimoto *et al.*, 1990, *Plant Physiol*, 93:857).

Em algumas formas de realização, o vetor pode também ser introduzido nas células vegetais por electroporação. (Fromm, *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 82:5824; Riggs *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad.*

*Sci. USA* 83:5602). Nesta técnica, os protoplastos vegetais são eletroporados na presença de plasmídeos contendo a construção com o gene. Impulsos elétricos de força de campo elevada permeabilizam reversivelmente as biomembranas permitindo a introdução dos plasmídeos. Os protoplastos vegetais eletroporados reformam a parede celular, dividem, e formam callus na planta. Adicionalmente à transformação direta, em algumas formas de realização, os vetores compreendem uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um gene heterólogo são transferidos utilizando transformação mediada por *Agrobacterium* (Hinchee *et al.*, 1988, *Biotechnology*, 6:915; Ishida *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:745). *Agrobacterium* é um género representativo da família gram-negativa das Rhizobiaceae. As suas espécies são responsáveis por tumores nas plantas, tais como a crista de galo e doença das raízes peludas. No tecido desdiferenciado característico dos tumores, são produzidos e catabolizados derivados de aminoácidos conhecidos como opinas. Os genes bacterianos responsáveis pela expressão de opinas são uma fonte conveniente de elementos de controlo para cassetes de expressão quimérica. Sequências genéticas heterólogas (*e.g.*, sequências de ácido nucleico ligadas operacionalmente ao promotor da presente invenção) podem ser introduzidas em células vegetais apropriadas, através do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (previamente descrito). O plasmídeo Ti é transmitido às células vegetais durante a infeção por *Agrobacterium tumefaciens*, e é integrado de forma estável no genoma da planta (Schell, 1987, *Science*, 237:1176).

Espécies que são sensíveis à infecção por *Agrobacterium* podem ser transformadas *in vitro*. Métodos de transformação para produzir plantas de sorgo transgênicas utilizando transformação mediada por *Agrobacterium* são fornecidos na Patente U.S. 6,369,298.

Em algumas formas de realização, o vetor é introduzido através da aceleração de partículas balísticas (Patente U.S. N°. 4,945,050; Casas *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11212).

Em algumas formas de realização, após seleção para o material vegetal transformado que pode expressar um gene heterólogo que codifica uma proteína heteróloga ou sua variante, são regeneradas plantas totais. A regeneração das plantas a partir de protoplastos em cultura é descrita em Evans *et al.*, *Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1: (MacMillan Publishing Co. New York, (1983); Vasil I. R. (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I, (1984) e Vol. III, (1986). É conhecido que muitas plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos em cultura, incluindo, mas não limitado a, todas as espécies principais de cana-de-açúcar, beterraba açucareira, algodão, árvores de fruto e outras árvores, legumes e vegetais, e monocotiledóneas (e.g., as plantas descritas acima). Os meios para a regeneração variam de espécie para espécie de plantas, mas de um modo geral a suspensão de protoplastos transformados contendo cópias do gene heterólogo é primeiro proporcionada. Forma-



se tecido de *callus* e podem ser induzidos rebentos a partir dos *callus* e subsequentemente desenvolvem-se raízes.

Alternativamente, pode ser induzida a formação de embriões a partir da suspensão de protoplastos. Estes embriões germinam e formam plantas maduras. Os meios de cultura conterão geralmente vários aminoácidos e hormonas, tais como auxinas e citoquininas. Os rebentos e as raízes normalmente desenvolvem-se em simultâneo. A regeneração eficiente irá depender do meio, do genótipo, e da história da cultura. A reprodutibilidade da regeneração depende do controlo destas variáveis.

### EXEMPLOS

#### **Exemplo 1- Resistência a herbicida em genótipo de sorgo**

As sementes do genótipo selvagem de sorgo apresentam um fenótipo de resistência a ALS, designado "Tailwind", e um genótipo de sorgo sensível ao herbicida designado 90SN7 foram plantados em vasos de 12 litros numa estufa. Vários de cada tipo de planta foram aspergidos com 1) herbicida Lightning (uma combinação de Imazethapyr e Imazapyr) à taxa de 2,56 oz acre<sup>-1</sup> (uma taxa de herbicida de 2x), 2) herbicida Steadfast © (DuPont™; uma combinação de Nicosulfuron e Rimsulfuron) a uma taxa de 1,50 oz acre<sup>-1</sup> (um herbicida a 2x), ou 3) uma combinação de herbicida Lightning a uma taxa de 2,56 oz acre<sup>-1</sup> e herbicida

Steadfast® a uma taxa de 1,50 oz acre<sup>-1</sup>. Para cada tratamento, as plantas Tailwind não apresentaram essencialmente nenhuma lesão após 12 dias de aplicação de herbicida, enquanto as plantas 90SN7 morreram, demonstrando que as Tailwind tinham resistência cruzada às classes IMI (Herbicida Lightning) e SU (Herbicida Steadfast ®) de herbicidas de inibição de ALS.

### **Exemplo 2 - Cruzamentos de Tailwind com linhas parentais de sorgo de elite**

Tailwind foi cruzado com várias linhas parentais de elite incluindo Tx430 e Wheatland. As populações F2 derivadas dos cruzamentos com estas linhas parentais foram avaliadas por análise de segregação para determinar o número de genes envolvidos na expressão de tolerância. As populações de plantas foram cultivadas numa estufa e foram aspergidas com taxas de 1x e 3x do herbicida Accent® (DuPont™; Nicosulfuron), herbicida Option® (BayerCrop-Science; Foramsulfuron), e herbicida Steadfast®. As contagens de população de plantas vivas/mortas permitiu as análises genéticas.

A análise de segregação indicou um gene principal, parcialmente dominante na população derivada de Tx430 para cada tratamento de herbicida. Análises de populações semelhantes derivadas dos cruzamentos com Wheatland indicaram um gene único principal, parcialmente dominante, assim como potencialmente dois ou três genes

modificadores que influenciaram a expressão relativa do traço de tolerância.

Os esforços de melhoramento de plantas foram iniciados por retrocruzamento do traço da tolerância em linhas parentais polinizadoras de sorgo de elite comercialmente importantes incluindo Tx430, Tx2737, Tx2783, 00MN7645, e HP162 assim como linhas parentais de sementes de sorgo de elite comercialmente importantes incluindo Wheatland, Tx3042, OK11, QL41 e Tx643, com seleção para a tolerância a herbicida em cada geração. A semente resultante do cruzamento de Tailwind com Tx2783 (BC2F3:F4) foi depositada em ATCC para acesso público.

### **Exemplo 3 - Sequência Genética para o gene de resistência a ALS**

Foram iniciados esforços de sequenciação genética para determinar se existia uma mutação para um sítio alvo para o fenótipo de tolerância ao herbicida. A pesquisa da sequência realizada utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do National Institute of Health na base de dados do The Institute for Genomic Research (TIGR) Plant Transcript Assemblies identificou uma Montagem de Transcrito representando um gene de ALS de sorgo (A3960\_4558; SEQ ID NO: 1). Foram concebidos iniciadores de amplificação para a reação em cadeia pela polimerase (PCR), F4r-CACATCACCCCTTGTACCAGCTC (SEQ ID NO: 3) e B5-GATTGTGCACATTGATATTGATCC (SEQ ID NO: 4), para amplificar

regiões do gene do sorgo análogas às regiões do gene AHAS de *Arabidopsis thaliana* que se pensa influenciar a expressão de tolerância ao herbicida ALS (*A. thaliana*: Ala122, Pro197, Ala205, Trp574, e Ser653; Tan *et al.*, 2005).

Os iniciadores de amplificação da reação em cadeia pela polimerase foram utilizados com sucesso para amplificar a região do gene em genótipos de sorgo resistentes ao herbicida (S1-1, S1-2 e S1-3) e sensíveis (Tx623 e Tx430) utilizando as seguintes condições do termociclador: desnaturação a 94 °C durante 60 segundos, emparelhamento a 62 °C durante 45 segundos, e extensão a 72 °C durante 45 segundos. Os produtos de amplificação por PCR foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e sequenciados nas instalações de sequenciação da Kansas State University. A sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 2) apresenta mutações em Val<sub>531</sub>Ile (GTC até ATC), correspondendo a *A. thaliana* Val<sub>560</sub>Ile, e Trp<sub>545</sub>Leu (TGG até TTG), correspondendo a *A. thaliana* Trp<sub>574</sub>Leu, em genótipos resistentes a herbicida (Figura 1).

<110> Kansas State University Research Foundation Tuinstra,  
Mitchell R. Al-Khatib, Kassim

<120> Sorgo Resistente ao herbicida da Sintase de  
acetolactato

<130> 69.67.102790/01

<140> PCT/US2007/086612

<141> 2007-12-06

<150> US 60/873,529

<151> 2006-12-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 2266

<212> DNA

<213> sorgo bicolor

<400> 1

gtgccccgc	ccaaaacct	cgcgccgct	ccgagacagc	cgccgcaacc	atggccacca	60
cgcgcggcg	cgctgcggc	gcgctagccg	gcgccactac	cgctgcggc	aaggcgaggg	120
gcccggcgca	cctcctggcc	gcacggcgcg	ccctcgccgc	gcccacagc	tgctcagcgg	180
cgccaccgc	cacgctgacg	gtgacggctc	ccccggccac	cccgtccgg	ccgtggggcc	240
ccaccgatcc	cgcgaagggc	gcccacatcc	tcgtcgaggg	tcttgagcgc	tgccggcgtcc	300
gcgacgtctt	cgcctacccc	ggcggcgcg	ccatggagat	ccaccaggca	ctcacccggt	360
cccccgcat	cgccaaccac	ctcttcggcc	acgagcaagg	ggaggccttc	gcgcctctg	420
gcttcgcgg	ctcctcgggc	cgcgctggcg	tctgcgtcgc	cacctccggc	cccggcgcca	480
ccaacctagt	ctccgcgctc	gcccagcgcg	tgctcgactc	cgtccccatg	gtcgccatca	540
cgggacaggt	tccgcggcgc	atgattggca	ccgacgcctt	ccaggagacg	cccacgctcg	600
aggtcaccgc	ctccatcacc	aaacataact	acctggctct	cgacgtcgac	gacatcccc	660
gcgctcgtgca	ggaggctttc	ttcctcgctc	cctccggctg	cccgggaccg	gtgcttgctg	720
acatccccaa	ggacatccag	cagcagatgg	ccgtgccggg	ctgggacacg	cccacgagtc	780
tgccctgggta	cattgcgcgc	cttcccaggc	ctcctcgac	tgaattgctt	gagcaggtgc	840
tgcgctcttgt	tggtgaatca	agggcgcctg	ttctttatgt	tggtggtggc	tgccgagcat	900
ctggcgagga	gttgcgccc	tttgtggaga	tgactggaat	cccagtcaca	actactctta	960
tgggccttgg	caatttcctt	ggcgacgacc	cactgtctct	gcgcatgctt	ggtatgcatg	1020
gcacgggtgta	tgcaaattat	gcagtgata	agggcgatct	gctgcttgc	tttgggtgtgc	1080
ggtttgatga	tcgtgtgaca	gggaagattg	aggcttttgc	aagcagggct	aagattgtgc	1140
acattgatat	tgatcccgtt	gagattggca	agaacaagca	gccacatgtg	tccatctgtg	1200

cagacgttaa gcttgctttg cagggcatga atgctcttct ggaaggaagc acatcaaaga 1260  
agagctttga ctttggtca tggcaagctg agttggatca gcagaagaga gagttcccc 1320  
ttgggtataa aacttttgat gacgagatcc agccacaata tgctattcag gttcttgatg 1380  
agctgacaaa aggggaggcc atcattgcc aaggtgttg gcagcaccag atgtgggagg 1440  
cacagtacta cacttacaag cggccaaggc agtgggtgtc ttcagctggt cttggggcta 1500  
tgggatttgg tttgccggct gctgctggcg ctgctgtggc caaccaggt atcactgttg 1560  
ttgacatcga cggagatggt agcttctca tgaacattca ggagctagct atgatccgaa 1620  
ttgagaacct cccagtgaag gtctttgtgc taaacaacca gcacctgggg atggtggtgc 1680  
agtgggagga caggttctat aaggccaata gagcacacac atacttggga aaccagaga 1740  
atgaaagtga gatatatcca gatttcgtga caattgccaa agggttcaac attccagcag 1800  
tccgtgtgac aaagaagagc gaagtccatg cagcaatcaa gaagatgctt gagactccag 1860  
ggccatacct cttggatata atcgtcccgc accaggagca tgtgttgctt atgatcccta 1920  
gtggtggggc tttcaaggat atgatcctgg atggtgatgg caggactgtg tattgatcta 1980  
aatttcagca tgcacatctc cctgccttc tttgacatgc atatgagctg gtacaagggt 2040  
gatgtgttat ttatgtgatg ttctctgtg ttctatcttt ttgtaagccg tcagctatct 2100  
atagtgtgct tgtttgatgt actctgttat ggtaatctta agtagttcc tacctttag 2160  
tgggtgtagc tgttgtttcg tgctggcata tctgtcatca gaggtcatgt aagtgccttt 2220  
tgctacagat aaataaggaa ataagcattg ctatgcagtg gttctg 2266

<210> 2

<211> 641

<212> PRT

<213> sorgo bicolor

<400> 2

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Gly Ala Thr  
1 5 10 15

Thr Ala Ala Pro Lys Ala Arg Arg Arg Ala His Leu Leu Ala Ala Arg  
20 25 30

Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ile Arg Cys Ser Ala Ala Pro Pro Ala Thr  
35 40 45

Leu Thr Val Thr Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro  
50 55 60

Thr Asp Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg  
65 70 75 80





340					345					350					
Ile	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp
		355					360					365			
Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Ala
		370					375					380			
Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Met	Asn	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser
385						390					395				400
Thr	Ser	Lys	Lys	Ser	Phe	Asp	Phe	Gly	Ser	Trp	Gln	Ala	Glu	Leu	Asp
				405					410					415	
Gln	Gln	Lys	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Thr	Phe	Asp	Asp	Glu
			420					425					430		
Ile	Gln	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly
		435					440					445			
Glu	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala
		450				455					460				
Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser	Ser	Ala	Gly
465						470					475				480
Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Val
				485					490						495
Ala	Asn	Pro	Gly	Ile	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe
			500					505					510		
Leu	Met	Asn	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Met	Ile	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Pro
		515					520					525			
Val	Lys	Val	Phe	Val	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val	Gln
		530					535				540				
Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu	Gly
545						550					555				560
Asn	Pro	Glu	Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Phe	Val	Thr	Ile	Ala
				565					570					575	
Lys	Gly	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys	Ser	Glu	Val
			580					585					590		
His	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu
		595					600					605			

Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser  
610 615 620

Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val  
625 630 635 640

Tyr

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 3

cacatcaccc ttgtaccagc tc 22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 4

gattgtgcac attgatattg atcc 24

**REIVINDICAÇÕES**

1. Molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que confere resistência à inibição por um ou mais herbicidas da sintase de acetolactato, em que a referida sequência compreende:

(i) uma sequência que compreende The Institute for Genomic Research Transcript Assembly number TA3960\_4558, que possui a sequência:

GTGCCCCCGCCCCAAACCCTCGCGCCGCTCCGAGACAGCCGCCGCAA  
CCATGGCCACCACCGCCGCGCCGCTGCCGCCGCGCTAGCCGGCGCCA  
CTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGGCGCACCTCCTGGCCGCAC  
GGCGCGCCCTCGCCGCGCCCATCAGGTGCTCAGCGGCGCCACCCGCCA  
CGCTGACGGTGACGGCTCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCCGTGGGGCC  
CCACCGATCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTCGAGGCTCTTGAGC  
GCTGCGGGCTCCGCGACGTCTTCGCTACCCCGGGCGGCGGTCCATGG  
AGATCCACCAGGCACTCACCCGTTCCCCCGTCATCGCCAACCACCTCT  
TCCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCTCTGGCTTCGCGCGCT  
CCTCGGGCCGCGTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCA  
CCAACCTAGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCCA  
TGGTCGCCATCACGGGACAGGTTCCGCGGGCGCATGATTGGCACCGACG  
CCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAAC  
ATAACTACCTGGTCCCTCGACGTCGACGACATCCCCCGCGTCGTGCAGG  
AGGCTTTCTTCCCTCGCTCCTCCGGTCGCCCCGGACCGGTGCTTGTGCA  
CATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACA  
CGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTCCAAGCCTCCTG  
CGACTGAATTGCTTGAAGCAGGTGCTGCGTCTTGTGGTGAATCAAGGC  
GCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGCTGCGCAGCATCTGGCGAGGAGTT  
GCGCCGCTTTGTGGAGATGACTGGAATCCCAGTCACA ACTACTCTTAT  
GGGCCTTGGCAATTTCCCTGGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTT  
GGTATGCATGGCACGGTGTATGCAAATTATGCAGTGGATAAGGCGGAT  
CTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAG  
ATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCTAAGATTGTGCACATTGATATTGAT  
CCCCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCA  
GACGTTAAGCTTGTCTTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAAGC  
ACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCATGGCAAGCTGAGTTGGAT  
CAGCAGAAGAGAGAGTTCCTTGGGTATAAACTTTTGATGACGAG

ATCCAGCCACAATATGCTATTCAGGTTCTTGATGAGCTGACAAAAGGG  
GAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGCAGCACCAGATGTGGGCGGC  
ACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGGCAGTGGTTGTCTTCAGCTGG  
TCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCGGCTGCTGCTGGCGCTGCTGTG  
GCCAACCCAGGTATCACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTC  
CTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTATGATCCGAATTGAGAACCTCCCA  
GTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG  
TGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACATACTTGGG  
AAACCCAGAGAATGAAAGTGAGATATATCCAGATTTTCGTGACAATTGC  
CAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAG  
TCCATGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACTCCAGGGCCATACCTCT  
TGGATATAATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGTTGCCTATGATCCCTA  
GTGGTGGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTG  
TGTATTGATCTAAATTCAGCATGCACATCTCCCTGCCTTTCTTTGACA  
TGCATATGAGCTGGTACAAGGGTGTGATGTGTTATTTATGTGATGTTCTCC  
TGTGTTCTATCTTTTTGTAAGCCGTCAGCTATCTATAGTGTGCTTGTGTTG  
ATGTA CTCTGTTATGGTAATCTTAAGTAGTTTCCTACCTTG TAGTGGTG  
TAGTCTGTTGTTTCGTGCTGGCATATCTGTCATCAGAGGTCATGTAAGT  
GCCTTTTGCTACAGATAAATAAGGAAATAAGCATTGCTATGCAGTGGT  
TCTG

ou uma sequência pelo menos 95% homóloga a esta, e que compreende ainda as substituições de nucleótidos de guanina substituída com adenina na posição 1641 e guanina substituída por timina na posição 1684; ou

(ii) um gene de resistência a sintase de acetolactato como se encontra em ATCC N°. PTA-7999, ou uma sequência pelo menos 95% homóloga a esta que compreende ainda as substituições de nucleótidos de guanina substituída com adenina na posição 1641 de TA3960\_4558 cuja sequência é

apresentada acima sob (i) e guanina substituída por timina na posição 1684 de TA3960\_4558.

2. Molécula de ácido nucleico da reivindicação 1, em que a sequência de aminoácidos codificada compreende a sequência de aminoácidos deduzida de The Institute for Genomic Research Transcript Assembly number TA3960\_4558, que possui a sequência:

```
MATTAATAAALAGATTAAPKARRRAHLLAARRALAAPIRCSAAPPATLTVTAPP
ATPLRPWGPTDPRKGADILVEALERCVRDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVIANHL
FRHEQGEAFAASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALDSVPMVAITGQ
VPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRVVQEAFGLASSGRPGPVLV
DIPKDIQQQMAVPVWDTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRRLVGESRRPVLYVGG
GCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFPGDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVD
KADLLAFGVRFDDRVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLAL
QGMNALLEGSTSKKSFDFGSWQAEKDQKREFPLGYKTFDDEIQPQYAIQVLDEL
TKGEAIIATGVGQHQMWAQAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGAAVAN
PGITVVDIDGDGSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQHLMVVQWEDRFYKAN
RAHTYLGPNPENESIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDI
IVPHQEHLVPMIPSGGAFKDMILDGDGRTVY
```

que compreende ainda as substituições de aminoácidos de Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu.

3. Vetor que compreende a molécula de ácido nucleico da reivindicação 1 ou reivindicação 2 ligados operacionalmente a um promotor e ligado operacionalmente a pelo menos uma sequência reguladora.

4. Célula compreendendo o vetor da

reivindicação 3, em que a célula é uma célula vegetal.

5. Vírus de RNA que compreende a molécula de ácido nucleico da reivindicação 1 ou reivindicação 2.

6. Parte de planta de sorgo que compreende a molécula de ácido nucleico da reivindicação 1 ou reivindicação 2.

7. Parte de planta de sorgo da reivindicação 6, em que a parte da planta de sorgo é uma semente ou tecido vegetal.

8. Método para transformar uma célula vegetal que compreende transformar a referida célula com o vetor da reivindicação 3.

9. Método da reivindicação 8, compreendendo ainda o passo de regenerar uma planta transgênica a partir da célula vegetal transformada.

10. Polipéptido codificado pela molécula de ácido nucleico da reivindicação 1 ou da reivindicação 2.

11. Polipéptido da reivindicação 10, em que o polipéptido compreende a sequência de aminoácidos deduzida de The Institute for Genomic Research Transcript Assembly number TA3960\_4558, que possui a sequência:



MATTAATAAALAGATTAAPKARRRAHLLAARRALAAPIRCSAAPPATLTVTAPP  
ATPLRPWGPTDPRKGADILVEALERCVRDVFAYPPGGASMEIHQALTRSPVIANHL  
FRHEQGEAFAASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALDSVPMVAITGQ  
VPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRVVQEAFGLASSGRPGPVLV  
DIPKDIQQQMAVPVWDTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPVLYVGG  
GCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFPGDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVD  
KADLLAFGVRFDDRVTGKIEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLAL  
QGMNALLEGSTSKKSFDFGSWQAELDQQKREFPLGYKTFDDEIQPQYAIQVLDEL  
TKGEAIIATGVGQHQMWAQAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLPAAAGAAVAN  
PGITVVDIDGDGSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQHLGMVVQWEDRFYKAN  
RAHTYLGPNPENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDI  
IVPHQEHVLPMIPSGGAFKDMILDGDGRTVY

que compreende ainda as substituições de  
aminoácidos de Val<sub>531</sub>Ile e Trp<sub>545</sub>Leu.

Lisboa, 22 de setembro de 2017

FIGURA 1

	1634	1640		1650	1660	1670	1680		1690	1700	1710
—projeto Genome	1631	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
(c) 22 F4r-Tx623	508	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
32 B5-Tx623	473	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
9 B5-Tx623	471	CCCAGTGAAG	GTC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
10 B5-S1-1	477	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
11 B5-S1-2	472	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
12 B5-S1-3	474	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		
(c) 21 F4r-S1-3	502	CCCAGTGAAG	ATC	TTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAG				TGG	GAGGACAGGPTCTATAAGGCCAATAGAG		

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Documentos de patentes citadas na descrição**

- US 60873529 B
- US 5767361 A
- US 5853973 A
- US 5187267 A
- US 5057422 A
- US 6369298 B
- US 5981839 A
- US 6051757 A
- US 5981840 A
- US 5824877 A
- US 4940838 A
- EP 116718 A
- WO 8402913 A
- US 02919 A
- US 02920 A
- US 5501967 A
- US 5846795 A
- US 5500380 A
- US 5173410 A
- US 5965794 A
- US 5977438 A
- US 5866785 A
- WO 9307278 A
- US 5451513 A
- US 5545817 A
- US 5545818 A
- WO 9516783 A
- EP 0292435 A
- US 4945050 A |
- US 2007086612 W

**Literatura de não patentes citada na descrição**

- TAN et al. *Pest. Manag. Sci.*, 2005, vol. 61, 246-257
- GIRIJASHANKAR et al. *Plant Cell Rep.*, 2005, vol. 24, 513-522
- SLEPER; POEHLMAN. *Breeding Field Crops*. Blackwell Publishing, 2006
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989
- AUSUBEL, F. M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1989
- CHAO et al. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 120, 979-992
- ODELL et al. *Nature*, 1985, vol. 313, 810
- ROSENBERG et al. *Gene*, 1987, vol. 56, 125
- GUERINEAU et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 262, 141
- PROUDFOOT. *Cell*, 1991, vol. 64, 671
- SANFACON et al. *Genes Dev.*, 1990, vol. 5, 141
- MOGEN et al. *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 1261
- MUNROE et al. *Gene*, 1990, vol. 91, 151
- BALLAS et al. *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 7891
- JOSHI et al. *Nucleic Acid Res.*, 1987, vol. 15, 9627
- KALDERON et al. *Cell*, 1984, vol. 39, 499
- LASSNER et al. *Plant Molecular Biology*, 1991, vol. 17, 229
- JOSHI. *Nucleic Acids Research*, 1987, vol. 15, 6643
- CROSSWAY et al. *BioTechniques*, 1986, vol. 4, 320
- FRALEY et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982, vol. 79, 1859
- PASZKOWSKI et al. *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 2717
- HAYASHIMOTO et al. *Plant Physiol.*, 1990, vol. 93, 857
- FROMM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 5824
- RIGGS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 5602
- LUEHRSEN; WALBOT. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 225, 81
- MESSING; VIERRA. *Gene*, 1982, vol. 19, 259
- BEVAN et al. *Nature*, 1983, vol. 304, 184
- WHITE et al. *Nucl Acids Res*, 1990, vol. 18, 1062
- SPENCER et al. *Theor. Appl. Genet.*, 1990, vol. 79, 625
- BLOCHLINGER; DIGGELMANN. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 4, 2929
- BOUROUIS et al. *EMBO J.*, 1983, vol. 2, 1099
- HERRERA-ESTRELLA. *Nature*, 1983, vol. 303, 209-213
- FRALEY et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 4803-4807
- HORSCH et al. *Science*, 1984, vol. 223, 496-498
- DEBLOCK et al. *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 1681-1689
- SVAB et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, vol. 87, 8526
- STAUB; MALIGA. *Plant Cell*, 1992, vol. 4, 39
- STAUB; MALIGA. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 601 [0083]
- SVAB; MALIGA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, vol. 90, 913
- CROSSWAY. *Mol. Gen. Genet.*, 1985, vol. 202, 179
- KRENS et al. *Nature*, 1982, vol. 296, 72
- HINCHEE et al. *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 915
- ISHIDA et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 745
- SCHELL. *Science*, 1987, vol. 237, 1176
- CASAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 11212
- EVANS et al. *Handbook of Plant Cell Cultures*. MacMillan Publishing Co, 1983, vol. 1
- *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Acad. Press, 1984, vol. I
- *CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS*. 1986, vol. III