

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99.896

REQUERENTE: AMERICAN CYANAMID COMPANY, norte-americana,
industrial, com sede em Wayne, New Jersey,
Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE UMA ENZIMA SINTE-
TASE DE ACETO-HIDROXIÁCIDOS (AHAS) RESISTENTE
A HERBICIDAS"

INVENTORES: JOHN MARK HAND, BIJAY KUMAR SINGH e ROY
SCOTT CHALEFF

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

27 de Dezembro de 1990 No.07/633,210, nos Estados Unidos
da América do Norte

99.896

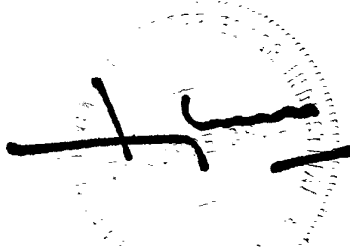
~~15~~

AMERICAN CYANAMID COMPANY
"MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE UMA ENZIMA SINTETASE DE ACETO-HI-
DROXIÁCIDOS (AHAS) RESISTENTE A HERBICIDAS"
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um método para a expressão de uma enzima sintetase de aceto-hidroxiácidos (AHAS) resistente a herbicidas numa célula hospedeira, que consiste na transformação da célula hospedeira com uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma enzima AHAS funcional, enzima essa que tem uma sequência de aminoácidos a qual difere da da sequência de AHAS tipo selvagem por ter pelo menos uma deleção de aminoácidos que confere à enzima resistência a herbicida, e na cultura da célula hospedeira em condições que permitem a expressão da enzima. As novas sequências de ácido nucleico codificadoras de enzimas AHAS resistentes a herbicidas contêm deleções de um ou mais aminoácidos nas regiões "conservadas" da molécula de AHAS. São também descritos métodos para a produção de vectores contendo novas sequências, assim como plantas e células vegetais resistentes a herbicidas transformadas por eles.



Este invento está relacionado com novas sequências de DNA que codificam novas formas variantes da enzima ácido acetoxi-hidroxi-sintetase (daqui em diante AHAS). A enzima AHAS é uma enzima crítica normalmente produzida numa variedade de plantas e numa gama larga de microorganismos. A função normal de AHAS é inibida por uma série de diferentes tipos de herbicidas, no entanto, as novas enzimas AHAS codificadas pelas sequências de DNA mutantes funcionam normalmente de forma catalítica mesmo na presença de tais herbicidas e, portanto, conferem resistência a herbicidas à planta ou microorganismo que as contêm.

As novas sequências de DNA são baseadas na observação inesperada de que a deleção de um ou mais aminoácidos específicos em certas regiões da sequência do gene normal de AHAS resulta numa enzima totalmente funcional, mas torna a enzima resistente à inibição por uma variedade de tipos diferentes de herbicidas, incluindo imidazolinonas, triazolopirimidinas e sulfonilureias. A disponibilidade destas sequências variantes proporciona um instrumento para a transformação de uma variedade de plantas cultivadas diferentes para resistência a herbicidas, assim como proporciona novas marcas seleccionáveis para usar noutros tipos de experiências de transformação genética.

FUNDAMENTO DO INVENTO

A utilização de herbicidas em agricultura encontra-se largamente espalhada. Se bem que exista um largo número compostos disponíveis que destroem eficazmente ervas daninhas, nem todos os herbicidas são capazes de se direccionarem selectivamente para as plantas indesejáveis no meio das plantas cultivadas, assim como não serem tóxicos para animais. Muitas vezes, é necessário estabelecer compostos que sejam simplesmente menos tóxicos para

as plantas cultivadas do que para as ervas daninhas. Para ultrapassar este problema, o desenvolvimento de plantas cultivadas resistentes a herbicidas tornou-se um dos principais focos da investigação agrícola.

Um aspecto importante do desenvolvimento de resistência a herbicidas é uma compreensão de como o herbicida funciona na inibição do crescimento da planta e depois manipulação da via bioquímica afectada na planta cultivada de forma a que seja evitado o efeito inibidor enquanto a planta mantém a sua função biológica normal. Uma das primeiras descobertas do mecanismo bioquímico dos herbicidas relacionada com uma série de compostos herbicidas não relacionados estruturalmente, as imidazolinonas, as sulfonilureias e as triazolopirimidinas. Sabe-se agora (Shaner et al. Plant Physiol. 76:545-546, 1984. Patente U.S. Nº 4,761,373) que cada um destes herbicidas inibe o crescimento das plantas por interferência com uma enzima celular integral, aceto-hidroxiácido-sintetase (AHAS; também referida como acetolacetato-sintetase ou ALS). AHAS é necessária para a síntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina.

Sabe-se que a enzima AHAS está presente em todas as plantas superiores, sendo encontrada também numa variedade de microorganismos, tais como leveduras Saccharomyces cerevisiae e bactérias entéricas, Escherichia coli e Salmonella typhimurium. A base genética para a produção de AHAS normal numa série destas espécies também foi bem caracterizada. Por exemplo, tanto em E. coli como em S. typhimurium existem três isozimas de AHAS; duas destas são sensíveis a herbicidas enquanto uma terceira não é. Cada uma destas isozimas possui uma subunidade proteica grande e uma pequena; e estão mapeadas nos operões IlvIH, IlvGM e IlvBN. Na levedura uma só isozima AHAS foi mapeada no locus ILV2. Em cada um dos casos, formas sensíveis e resistentes foram

identificadas e determinadas sequências dos vários alelos (Friden et al., Nucl. Acid Res. 13: 3979-3993, 1985; Lawther et al., PNAS USA 78: 922-928, 1982; Squires et al., Nucl. Acid. Res. 811: 5299-5313, 1983; Wek et al., Nucl. Acids Res. 13:4011-4027, 1985; Falco e Dumas, Genetics 109, 21-35; falco et al., Nucl. Acids Res. 13:4011-4027, 1985).

No tabaco, a função de AHAS é codificada por dois genes não ligados, SuRA e SuRB. Existe substancial identidade entre os dois genes tanto a nível de nucleótidos como de aminoácidos na proteína madura, se bem que a região putativa de trânsito N-terminal difira mais substancialmente (Lee et al., EMBO J. 7: 1241-1248, 1988). Por outro lado Arabidopsis tem um só gene AHAS, o qual também foi completamente sequenciado. As comparações entre sequências dos genes AHAS em plantas superiores indica um nível elevado de conservação de certas regiões da sequência; especificamente, existem pelo menos 10 regiões de conservação de sequência. Foi anteriormente assumido que estas regiões conservadas são críticas para a função da enzima e que a retenção daquela função está dependente de conservação substancial de sequências.

Foi recentemente descrito (EP 0257993) que os mutantes apresentando resistência a herbicidas possuem mutações em pelo menos um aminoácido numa ou mais destas regiões conservadas. Em particular, a substituição de aminoácidos selvagens por certos aminoácidos nestes sítios específicos na sequência AHAS mostrou-se ser tolerada e de facto resultou em resistência a herbicidas das plantas possuidoras desta mutação, se bem que mantendo a função catalítica. Mostrou-se que estas mutações ocorrem em ambos os loci SuRA e SuRB no tabaco; mutações semelhantes foram isoladas em Arabidopsis e levedura.

Descobriu-se agora inesperadamente que as deleções de um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais destas regiões "conservadas" resulta não só numa enzima AHAS funcional como também resulta em resistência a herbicidas. A conservação de sequências normalmente implica que qualquer alteração nestas regiões não será tolerada e portanto resultará numa proteína não funcional. No entanto, no presente caso, é particularmente surpreendente que a função da enzima é mantida, face ao facto de não só eliminarem um resíduo e aminoácido que é um componente estrutural da enzima como também resultam necessariamente em desfasamento de resíduos, destruindo assim a aparente conservação da sequência contendo a mutação. Assim são proporcionadas novas sequências de ácido nucleico úteis na transformação de plantas sensíveis a herbicidas para dar plantas resistentes a herbicidas. As plantas assim transformadas proporcionam a base para o desenvolvimento de novas variedades de plantas resistentes a herbicidas.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona novas sequências de ácido nucleico codificadoras de enzimas AHAS funcionais insensíveis a uma variedade de herbicidas. as sequências em questão compreendem a deleção de um ou mais dos codões codificadores de um aminoácido específico dentro de uma ou mais das chamadas regiões conservadas na molécula AHAS selvagem. A identidade destes sítios será discutida mais detalhadamente abaixo. As sequências de DNA alteradas são úteis em métodos para a produção de células vegetais resistentes a herbicidas, os referidos métodos compreendendo transformação de uma célula vegetal alvo com uma ou mais das sequências alteradas proporcionadas aqui. Como alternativa, a mutagénesse é utilizada para criar mutantes de

deleção em células vegetais ou sementes contendo uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma AHAS sensível a herbicida. Tais células vegetais foram então passadas a cultura de tecidos para regenerar plantas que possuem resistência a herbicidas ou característica insensível. O invento também engloba células vegetais, culturas de tecidos vegetais, plantas adultas e sementes de plantas que possuem as sequências de ácido nucleico mutante de deleção e que expressam enzimas AHAS funcionais resistentes a herbicidas.

A disponibilidade destas novas plantas resistentes a herbicidas permite novos métodos de cultura de plantas cultivadas na presença de herbicidas. Em vez de crescerem plantas não resistentes, os campos podem ser plantados com as plantas resistentes do presente invento e o campo ser tratado rotineiramente com herbicida, sem danificação das plantas cultivadas. Os herbicidas preferidos para este fim são as imidazolidonas, sulfonilureias e triazolopirimidinas.

Os ácidos nucleicos mutantes deste invento também proporcionam novas marcas seleccionáveis para usar em experiências de transformação. A sequência de ácido nucleico codificadora de uma AHAS resistente está ligado a um segundo gene antes da transferência para uma célula hospedeira e toda a construção usada para transformar o hospedeiro. As células transformadas putativas são então crescidas em cultura na presença de quantidades inibidoras de herbicida; as células sobreviventes terão adquirido o segundo gene com interesse.

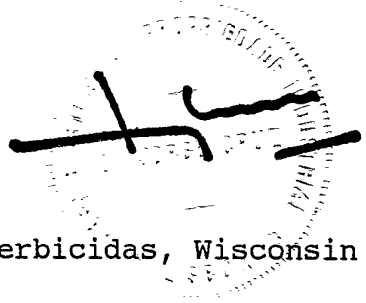
As definições que se seguem devem ser entendidas como aplicando-se ao longo da especificação e reivindicações. Uma enzima AHAS "funcional" ou "normal" é uma que é capaz de catalisar o primeiro passo na via para a síntese dos aminoácidos

essenciais isoleucina, leucina e valina. Uma sequência ou região "conservada" de AHAS é uma série de ácidos nucleicos ou aminoácidos dentro da sequência de ácido nucleico ou aminoácidos de AHAS que é a mesma em pelo menos duas das espécies tendo a enzima AHAS. Uma sequência AHAS "selvagem" é uma sequência presente num membro sensível a herbicidas de uma dada espécie. Uma planta "resistente" é uma que produz uma enzima AHAS normal e que é capaz de atingir a maturidade quando crescida na presença de níveis normalmente inibidores de herbicida. O termo "resistente", como aqui é usado destina-se a englobar plantas "tolerantes", i.e., as plantas que fenotipicamente evidenciam reacções adversas mas não letais a herbicidas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As Figuras 1a e 1b (Listagem de Sequências 1 e 2) mostram, respectivamente, as sequências de aminoácidos e de nucleótidos de AHAS selvagem de Arabidopsis. Na Figura 1a, as regiões inseridas em caixas indicam exemplos de subsequências em que as deleções podem ser feitas para produzir resistência a herbicidas. Os resíduos dentro de círculos identificam sítios específicos onde tais deleções podem ser feitas. Na Figura 1b, uma seta indica o começo da região codificadora.

A Figura 2 (a-c) mostra três fotografias de progénie (primeira geração), resultante de uma planta do tabaco transgénica (10-1) transformada com uma construção contendo uma mutação de deleção Trp574 de AHAS de Arabidopsis pulverizada após a emergência com o herbicida imidazolinona Pursuit^R a 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 160 gramas/hectare (g/ha). Todas as três fotografias foram tiradas 25 dias após pulverização. Em todas as fotografias, plantas testemunhas (um cultivar do tabaco selvagem)



relativamente à sensibilidade a herbicidas, Wisconsin 38 [W38]) estão na fila da frente.

(a) Testemunha W38 e auto 10-1 - W38 representa a testemunha e 10-1 a progénie de tabaco transgênico auto-cruzada. A 0 g/ha de Pursuit^R, tanto W38 como 10-1 parecem semelhantes. A 10 g/ha, a planta W38 é ligeiramente inibida no seu crescimento comparado com 10-1; no entanto, a partir de 20 g/ha, o crescimento de W38 é quase totalmente inibido. A 80 g/ha, o crescimento da planta 10-1 parece ser ligeiramente inibido e a 160 g/ha, o crescimento da planta 10-1 é claramente inibido.

(b) Testemunha W38 e 0 x 10-1 - W38 como anteriormente descrito. 0 x 10-1 representa W38 como progenitor maternal (0) e 10-1 como progenitor paternal. Os resultados são muito semelhantes aos observados nas fotografias de 10-1 autocruzada.

(c) Testemunha W38 e 10 x 0 - W38 como anteriormente descrito. 10-1 x 0 representa 10-1 como progenitor maternal e W38 como progenitor paternal (0). Os resultados são muito semelhantes aos observados na fotografia de 10-1 autocruzada excepto que nesta foto a segregação da característica resistência a herbicidas pode ser observada na progénie 10-1.

A Figura 3 ilustra o efeito da aplicação pós-emergência de Pursuit^R no crescimento de plantas do tabaco derivadas de semente, conforme medido pela altura da planta. C* representa a média do controle (cultivar progenitor susceptível), enquanto que cada barra subsequente representa uma progénie transgênica individual.

A Figura 4 ilustra o efeito do herbicida imidazolinona Pursuit^R sobre enzimas AHAS derivadas de uma E. coli transformada

com uma sequência de AHAS tendo uma deleção Trp574 [DEL], uma substituição Trp574 [SUB] e uma E. coli transformada com a sequência de AHAS selvagem.

A Figura 5 ilustra o efeito do herbicida sulfonilureia Glean^R sobre as enzimas AHAS extraídas de transformantes de E. coli. As abreviaturas são como na Figura 4.

A figura 6 ilustra os efeitos do herbicida imidazolinona Pursuit^R nas enzimas AHAS extraídas dos transformantes de E. coli. As enzimas são derivadas de uma E. coli transformada com uma deleção Ser653 [DEL], uma E. coli transformada com uma substituição Ser653 [SUB] e uma E. coli transformada com uma sequência AHAS selvagem [WT].

A Figura 7 ilustra o efeito do herbicida sulfonilureia Glean^R nas enzimas AHAS extraídas dos transformantes de E. coli. As abreviaturas são como na Figura 6.

A Figura 8 ilustra o efeito do herbicida imidazolinona Pursuit^R na enzima AHAS derivada de uma planta do tabaco com uma estirpe de Agrobacterium contendo um alelo mutante de AHAS de Arabidopsis tendo a deleção Trp574.

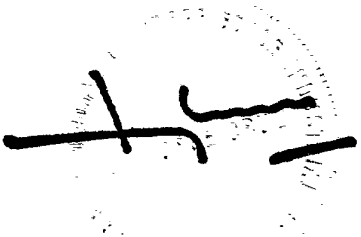
DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Toda a sequência de nucleótidos do gene AHAS numa série de organismos incluindo levedura, E. coli, Brassica, Arabidopsis, beterraba açucareira e tabaco foi anteriormente divulgado (Mazur et al., supra. Lee et al., EMBO J. 7:1241, 1988). Ainda, notou-se que a resistência a herbicidas está associada a uma ou mais mutações dentro da sequência AHAS; especificamente, a resistência

notou-se estar associada a certas substituições específicas de aminoácidos dentro da sequência. (EP 259 793; Yadav et al. PNAS USA 83:4418-22, 1986; Sathasivan et al., Nucl. Acids. Res. 18: 2188, 1990). Foi no entanto deduzido (Hartnett et al., em Managing Resistance to Agrichemicals, cap. 31, pp. 459-473, American Chemical Society, 1990; EP 259 793) que estas regiões de conservação nas quais ocorrem as mutações que conferem resistência devem geralmente ser mantidas para conservar a função enzimática.

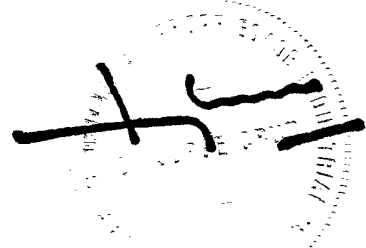
Descobriu-se agora inesperadamente que a conservação destas sequências não é aparentemente essencial para a função catalítica da molécula. No decurso do desenvolvimento do presente invento, a mutagênese dirigida da região codificadora de AHAS de Arabidopsis é utilizada para criar mutações de deleção em que um resíduo que anteriormente se mostrou ser substituível é então eliminado da sequência. A deleção de um resíduo claramente destrói a natureza conservada das regiões em que ocorre. No entanto, as mutações de deleção assim criadas retêm todas a função de AHAS, ao mesmo tempo apresentando resistência a herbicidas. Especificamente, as deleções simples dos resíduos Trp574, Pro197 e Ser653 e as deleções duplas de Pro197 e Ser653 são feitas para criar plantas resistentes a herbicidas totalmente funcionais. Toda a numeração dos aminoácidos apresentada baseia-se na sequência AHAS de Arabidopsis. No entanto, será compreendido que ao longo da especificação e reivindicações, a referência a um sítio específico de deleção na sequência de Arabidopsis pretende englobar os sítios correspondentes na sequência AHAS de qualquer outra espécie tendo um gene AHAS.

Face aos resultados, torna-se aparente que a conservação destas regiões associadas à resistência a herbicidas da molécula de AHAS não é crítico para a actividade catalítica e que uma ou mais deleções de aminoácidos numa ou mais sequências



de aminoácidos conservadas pode ser facilmente tolerado pela enzima e ainda, conferirá resistência a herbicidas à planta. O presente invento engloba sequências de DNA de AHAS nas quais foram feitas uma ou mais deleções relativamente à sequência selvagem, deleções essas que não alteram a função catalítica da enzima AHAS resultante, mas que conferem resistência a herbicidas. Tais mutações de deleção incluem, mas não estão limitadas a deleção de um ou mais codões, codificadores das chamadas "subsequências conservadas" como definido em EP 257 793. Estas são sequências de DNA codificadoras dos aminoácidos 119-122, 194-197, 201-208, 255-257, 348-353, 373-377 e 569-578 na AHAS de Arabidopsis. Em adição, uma outra "sequência conservada" na qual a substituição foi descrita e em que a deleção é útil para proporcionar resistência a herbicidas, é 650-653. A deleção de um codão, mais de um codão e até todos os codões nas "subsequências" descritas atrás, está considerado dentro do âmbito do invento. São preferidos os mutantes codificadores de deleções de codões tendo uma deleção de pelo menos uma posição de resíduo seleccionada do grupo constituído por aminoácidos 120, 121, 197, 205, 256, 351, 376, 571, 574, 578 e 653. São particularmente preferidas as sequências codificadoras das deleções 197, 574 ou 653.

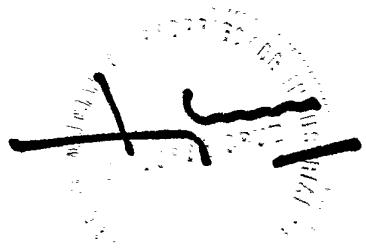
Se bem que as deleções atrás identificadas representem regiões em que se sabe que a variação é tolerada, é provável face à "flexibilidade" substancial da molécula que outras deleções são também possíveis. Por exemplo, outras regiões aparentemente conservadas da enzima AHAS também existem para além das descritas atrás. Se bem que não pretendendo estar ligado a qualquer teoria particular, parece provável que mais do que sendo sítios ligados à actividade catalítica da molécula e portanto necessitando de conservação estrutural essencial, a maior parte das regiões conservadas representam sítios de ligação para o herbicida. A deleção de um ou mais aminoácidos nestes sítios logicamente



evitariam a ligação do herbicida e consequentemente evitariam a interferência do herbicida com a actividade de AHAS. Usando este raciocínio, o conhecimento disponível relativamente às sequências conservadas de AHAS (Ver, e.g. Mazur et al., Plant Physiol. 85:1110-1117, 1987) e técnicas conhecidas, tais como mutagénese dirigida, será uma questão de rotina projectar mutantes de deleção adicionais com probabilidade de serem resistentes a herbicidas. Os mutantes putativos podem ser então despistados por crescimento na presença de quantidades inibidoras do herbicida com interesse para determinar se foi ou não conferida resistência a herbicidas.

Como acontece com todas as proteínas, a enzima AHAS funcional possui uma estrutura tridimensional que é o eventual resultado do arranjo linear dos aminoácidos componentes. A interacção dos grupos laterais dos aminoácidos produz uma estrutura secundária da proteína e posterior enrolamento resulta numa estrutura terciária da proteína. Uma arquitectura específica de uma dada proteína que finalmente resulta da sequência de aminoácidos pode ser crítica para a função da proteína. Assim, a substituição de um aminoácido retem a integridade estrutural da proteína, enquanto que a deleção de um aminoácido destrói eficazmente esta integridade estrutural e pode-se esperar que altere significativamente a estrutura tridimensional da proteína e ao fazê-lo altere a função da molécula. Assim, face à potencial danificação que pode ser causada pela deleção é particularmente surpreendente que a molécula resultante retenha as fracções suficientes da sua estrutura tridimensional para permanecer não só cataliticamente funcional como também para causar resistência a herbicidas.

os familiarizados com a matéria reconhecerão que os mutantes de deleção do presente invento não estão limitados à



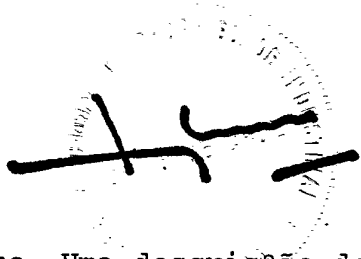
fonte de DNA ou enzima. Se bem que a presente programação experimental utilize principalmente a sequência do gene AHAS de Arabidopsis, mutações semelhantes podem ser feitas de rotina na sequência AHAS de qualquer organismo possuidor de tal gene, e.g. outras plantas superiores, leveduras, E. coli e outros microorganismos. As semelhanças no gene AHAS tipo selvagem entre todas as sequências conhecidas são tão grandes que torna-se uma questão de rotina criar mutantes idênticos nas sequências AHAS diferentes das de Arabidopsis. Como alternativa, podem ser construídos genes quiméricos que contêm a fracção do mutante de deleção do gene AHAS de Arabidopsis recombinado com fracções inalteradas do gene AHAS de outras fontes.

Os novos tipos de genes descritos aqui podem conferir resistência a um ou mais de um tipo de herbicida. Conforme já foi bem estabelecido, AHAS é o local de acção de várias classes distintas de herbicidas, nomeadamente imidazolinonas, sulfonilureias, triazolopirimidinas, sulfamoidureias e sulfonilcarbomidas. Tal como acontece com a resistência a herbicidas conferida pela substituição de aminoácidos a resistência a herbicidas conferida por tais mutações pode ser selectiva para um herbicida particular ou pode haver resistência cruzada a mais de um herbicida. Por exemplo, as deleções de Trp574 e Ser653 criam resistência cruzada a imidazolinonas e a sulfonilureias. No entanto alguém familiarizado com a matéria determinará facilmente a especificidade de qualquer mutante particular detectando separadamente na presença de e.g. imidazolinonas sózinhas ou sulfonilureias sózinhas e isolamento de plantas sobreviventes. A resistência cruzada pode ser determinada pelo crescimento na presença de mais de uma classe de herbicida. Os tipos de herbicida com os quais o presente invento é útil estão descritos por exemplo na Patente U.S. Nº 4,188,487; 4,201,565; 4,221,586; 4,297,128; 4,554,013; 4,608,079; 4,638,068; 4,647,301; 4,650,514; 4,698,092;

4,701,208; 4,709,036; 4,752,323; 4,772,311; e 4,798,619; Pat. U.S. Nos. 4,127,405; 4,435,206; 4,424,703; 4,417,917; 4,398,939; 4,394,506; 4,391,627; 4,383,113; 4,378,991; 4,372,778; 4,371,391; 4,370,480; 4,370,479; 4,369,320 (sulfonilureias).

Nesta altura demonstrou-se que AHAS não só está presente numa larga variedade de plantas, como também é um sítio crítico que determina a sensibilidade a herbicidas numa larga gama de plantas essencialmente não relacionadas, e.g. milho, Brassica, tabaco, linho, Arabidopsis e beterraba açucareira (Stougaard et al., Mol. Gen. Genet. 219: 413-420, 1989; Jordan & McHughen, J. Plant. Physiol. 131: 333-338, 1987; McHughen, Plant Cell Reports 8: 445-449, 1989). Como se observou atrás, em seguida é possível criar a mutação importante directamente na planta de interesse por técnicas mutagénicas conhecidas. (Ver por exemplo, Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; e Exemplo II, infra). No entanto, será frequentemente mais conveniente criar plantas transformadas com uma sequência de DNA conhecida e isolada compreendendo as deleções requeridas, como sejamos mutantes de deleção de Arabidopsis descritos no presente caso. Os plasmídeos contendo mutantes de deleção nas posições 574 e 653 foram depositados na American Type Culture Collection, Rockville, MD, em 6 de Dezembro, 1990 respectivamente com os números de acesso ATCC 68488 e 68489.

As sequências de DNA de AHAS do presente invento são úteis para transformar cultivares alvo e portanto conferir resistência a herbicidas sem a necessidade de mutagénese. Existe uma larga gama de técnicas para se conseguir transformação directa ou indirecta de plantas superiores com DNA exógeno e qualquer método pelo qual a nova sequência pode ser incorporada no genoma do hospedeiro e estavelmente herdada pela sua progénie,



está englobado no presente invento. Uma descrição detalhada de tal método é proporcionada nos exemplos que se seguem.

A transformação indirecta de células vegetais pode ser conseguida pela utilização de vectores. Um método comum de se conseguir a transformação é a utilização de Agrobacterium tumefaciens para introduzir um gene estranho na célula vegetal alvo. Por exemplo no presente caso, a sequência mutante de AHAS é inserida num vector plasmídeo contendo as sequências delimitantes no T-DNA do plasmídeo Ti. O plasmídeo é então usado para transformar E. coli. Realizou-se então uma conjugação triparental entre esta estirpe, uma estirpe de Agrobacterium contendo um plasmídeo Ti sem braços contendo as funções de virulência necessárias para efectuar a transferência das sequências de T-DNA contendo AHAS para o cromossoma da planta alvo e uma segunda estirpe de E. coli contendo um plasmídeo tendo sequências necessárias para mobilizar a transferência da construção de AHAS de E. coli para Agrobacterium. Uma estirpe de Agrobacterium recombinante, contendo as sequências necessárias para a transformação de plantas foi usada para infectar discos de folhas. Os discos foram cultivados em meios selectivos e os regenerantes transformados foram identificados. As plantas recuperadas são resistentes aos efeitos de herbicidas quando cultivadas na sua presença. Outros vectores de plantas, tais como vírus de plantas, também proporcionam um meio possível para a transferência de DNA exógeno.

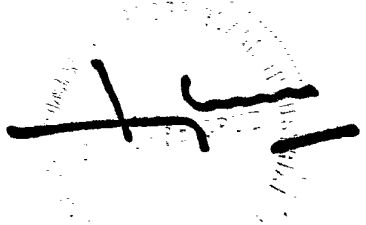
A transformação directa de células vegetais, em vez da utilização de vectores pode também ser empregue. Tipicamente os protoplastos da planta alvo são colocados em cultura na presença do DNA a ser transferido e um agente que promove a internalização de DNA pelos protoplastos é absorvido à sua superfície. São agentes úteis para isto o polietilenoglicol ou fosfato de cálcio.

Como alternativa, a internalização de DNA pode ser estimulada por electroporação. Neste método, um pulso eléctrico é usado para abrir poros temporários numa membrana celular de protoplasto e o DNA na solução envolvente é então paassado para o interior da célula através dos poros. De forma semelhante, a microinjecção pode ser empregue para libertar o DNA directamente numa célula e preferencialmente directamente no núcleo da célula.

Em cada uma das técnicas anteriores, a transformação ocorre numa célula vegetal em cultura. Subsequentemente à transformação, as células vegetais devem ser regeneradas para dar plantas completas. Técnicas para a regeneração de plantas maduras a partir de culturas de calos ou de protoplastos não são bem conhecidas para um grande número de espécies diferentes (ver, e.g., Handbook of Plant Cell Culture, Vols. 1-5, 1983-1989 McMillan, N.Y.). Assim, uma vez conseguida a transformação, está dentro do conhecido na área regenerar plantas maduras a partir de células vegetais transformadas.

São também conhecidos métodos alternativos que não requerem necessariamente a utilização de células isoladas e portanto, técnicas regenerativas, para se conseguir a transformação. Estas são geralmente referidas como métodos "balísticos" ou de "aceleração de partículas", em que partículas de metal revestidas com DNA são propeladas para as células vegetais por uma carga de pólvora (Klein et al., Nature 327: 70-73, 1987) ou descarga eléctrica (EPO 270356). Desta forma, as células vegetais em cultura ou órgãos reprodutores vegetais ou células, e.g. pólen, podem ser transformados estavelmente com a sequência de DNA com interesse.

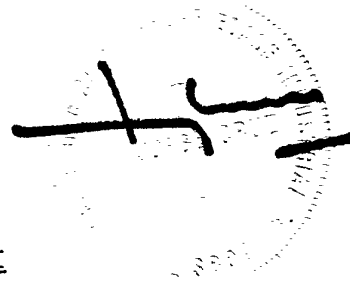
O presente invento pode ser aplicado à transformação de virtualmente qualquer tipo de planta tanto monocotiledónia como



dicotiledônia. Entre os cultivares para os quais a transformação para resistência a herbicidas está contemplada estão o milho, trigo, milho painço, aveia, cevada, sorgo, alfafa, beterraba sacarina, espécies de Brassica, tomateiro, pimenteiro, soja, tabaco, melão, abóbora, batata, amendoim, ervilha, algodão ou cacau. As novas sequências podem ser também usadas para transformar espécies ornamentais, como a seja a rosa e espécies que dão madeira, como seja o pinho.

As novas sequências do invento também são úteis como marcas selectivas em estudos genéticos com plantas. Por exemplo, na transformação de plantas, sequências codificadoras de resistência a herbicidas podem ser ligadas a um gene de interesse o qual se destina a usar para transformar um alvo do herbicida - célula vegetal sensível. A construção compreendendo o gene com interesse e a sequência resistente a herbicidas são introduzidos na célula vegetal e as células vegetais são então cultivadas na presença de uma quantidade inibidora do herbicida. As células vegetais sobreviventes a tal tratamento presumivelmente adquiriram o gene de resistência assim como o gene com interesse e, portanto, os transformantes putativos são facilmente identificáveis.

O invento é ainda ilustrado pelos exemplos não limitantes que se seguem.



EXEMPLO I

Isolamento de um Clone Genômico Codificador de AHAS de Arabidopsis

Um fragmento EcoRI cde 2,1 Kb englobando o promotor, peptídeo de trânsito e uma fracção da região codificadora madura de AHAS de Arabidopsis foi marcado com 32 Ppor "nick translation" (Maniatis et al., Molecular Clonong: A Laboartory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) e utilizou como sonda de hibridação para o despiste de uma biblioteca genômica preparada a partir de DMNA genômico de Arabidopsis thaliana (Clontech, Palo Alto, CA). Os filtros foram hibridados durante 24 horas a 42°C em 6xSSC, 5X solução de Denhardt, fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2, 0,1% SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Os filtros foram lavados várias vezes a 60°C em 1x SSC e 0,1% SDS. Seis bacteriófagos recombinantes (A22, A31, A42, A52, A72, A83) foram classificados como positivos putativos. Estes bacteriófagos foram purificados em placas e usados para infectar a baixa multiplicidade E. coli estirpe 802 em caldo líquido NZY (NZCYM é 10 g de NZ amina, 5g de NaCl, 5g de extrato de levedura, 1 g de casaminoácidos, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 10 ml de 1M Tris-HCl, pH 7,2) como descrito por Maniatis et al., supra. As culturas líquidas foram incubadas durante a noite com agitação constante (300 rpm) a 37°C. Os 50 ml de suspensão foram ajustados a 1M NaCl e 8% de PEG pela adição de NaCl sólido e polietilenoglicol sólido. A suspensão foi incubada durante a noite a 4°C para precipitar o bacteriófago. O bacteriófagos foram sedimentados via centrifugação a 18 000 xg durante 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 2 ml de tampão TM (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$), colocado sobre um gradiente de descontínuo de CsCl (4,8M CsCl, 4,0M CsCl e 3,2M CsCl) e centrifugado a 50 000 xg durante 1 hora num rotor basculante SW60. A banda de fagos foi removida da

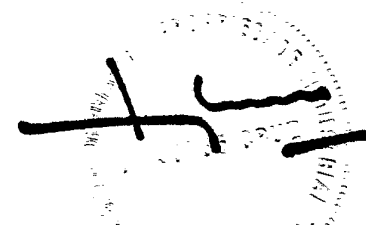
interface de 4,0/3,2M CsCl para um tubo Eppendorf de 1,5 ml e o bacteriófago foi lisado pela adição de 1 volume de formamida e incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. O DNA foi recuperado ajustando a solução a 10mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1mM Na₂-EDTA e precipitação do DNA pela adição de 2 volumes de etanol a 100%. O DNA do bacteriófago foi recuperado por centrifugação, lavado com etanol a 70% e ressuspensão em tampão TE (tampão TE é 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM Na₂-EDTA). O DNA purificado foi extraído de rotina uma a várias vezes com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), precipitado com etanol e ressuspensão em 50-100 µl de tampão TE antes da digestão com várias enzimas de restrição.

As preparações de DNA de seis fagos recombinantes foram digeridas com várias enzimas de restrição e resolvidas por electroforese num gel de 1% de agarose. O DNA foi transferido para nitrocelulose (Southern) e hibridado (24 hr a 60°C em 2xSSC, 5x solução de Denhardt, 50 mM fosfato de sódio, pH 7,2, 0,1% SDS e 100 µg/ml de DNA de espermatozoides de salmão desnaturado) contra um fragmento NcoI/EcoRI de 900 pb marcado radioactivamente representando a região 3' do fragmento EcoRI de 2,1 Kb (o peptídeo de trânsito e a fracção 5'da região codificadora madura). O filtro foi lavado duas vezes a 65°C em 0,5xSSC e 0,1% SDS. O fragmento NcoI/EcoRI de 900 pb hibrida com um fragmento XbaI de 5,5 Kb e com um fragmento EcoRI de 2,1 Kb de A42 e A52. Estes resultados estão de acordo com a informação publicada respeitante à clonagem e caracterização da sequência genómica codificadora de AHAS Arabidopsis (Mazur et al., Plant Physiol., 85: 1110-1117, 1987).

O bacteriófago A52 foi escolhido para posterior análise. O fragmento XbaI de 5,5 Kb de A52 foi isolado a partir de um gel de 1% de agarose e purificado através de um sistema de

electroeluição IBI como sugerido pelo fabricante. O fragmento XbaI de 5,5 Kb foi precipitado com etanol e ressuspensão em H₂O destilada. Estes fragmentos foram ligados ao DNA de plasmídeo pSK(-) digerido com XbaI (adquirido da Stratagene, La Jolla, CA). Os fragmentos foram ligados durante 16-24 horas a 14°C num volume de 20 µl como descrito em Maniatis, et al., supra. Após incubação, o volume de reacção de 20 µl foi diluído para 100 µl com 100 mM Tris-HCl, pH 7,2. Vinte cinco µl desta amostra foi ainda diluído para 100 µl com 100 mM Tris-HCl, pH 7,2 e incubado com 100 µl de células competentes HB101 [preparadas exactamente como descrito por Morrison (Meth. Enzymol. 68: 326-331, 1979)]. A mistura de transformação plasmídeo/E. coli foi incubada em gelo durante 20 minutos; transferido para 42°C durante 2 minutos; temperatura ambiente durante 10 minutos; seguido imediatamente da adição de 1 ml de caldo LB (caldo LB é 10 g de bacto-triptona; 5 g de extracto de levedura; 5 g de NaCl e 10 ml de 1M Tris-HCl, pH 7,2 por litro) e ainda incubação a 37°C durante 20 minutos. Os veículos de clonagem plasmídeos usados neste trabalho são portadores do gene que confere resistência à ampicilina ou canamicina. Portanto, 200 µl de cada uma das misturas de transformação foram semeados directamente em placas LB_{amp} ou LB_{can} (100 µg/ml de qualquer um dos antibióticos) e incubado a 37°C durante 12-20 horas, dependendo do tamanho das colónias.

As colónias foram transferidas para 3 ml de LB_{amp} ou LB_{can} e incubadas durante a noite a 37°C com agitação constante. As preparações de DNA de plasmídeo em pequena escala foram preparadas por modificações pequenas do método de lise alcalina descrito por Maniatis, et al. supra. De rotina, 400 µl da cultura de 3 ml crescida durante a noite foram semeados num tubo Eppendorf de 1,5 ml e ressuspensão em 150 µl de solução GTE (solução GTE é 50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 10 mM Na₂EDTA) e incubado em gelo durante 20 minutos, seguido da adição de 300 µl de

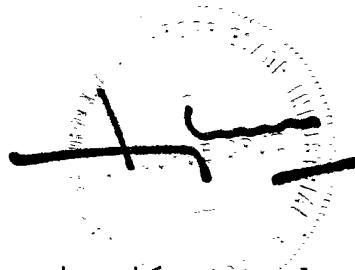


solução alcalina contendo SDS e 200 μ l de 5M K^+ /3M OAc nos intervalos de tempo recomendados. O sedimento de DNA final foi ressuspenso em 40 μ l de RNase A a 50 μ g/ml em tampão TE. Quinze μ l de DNA de plasmídeo foi removido para digestão de restrição. Dois plasmídeos, pAC301 (5'-->3') e pAC302 (3'-->5'), representam construções contendo o fragmento XbaI de 5,5 Kb ligado ao sítio XbaI do pSK(-). Posterior análise de restrição de pAC301 e de pAC302 confirmou a presença da região do promotor, peptídeo de trânsito, região codificadora madura e regiões 3' não traduzidas da sequência genômica codificadora de AHAS de Arabidopsis (Mazur et al., supra).

EXEMPLO II

Mutagenese dirigida com oligonucleótidos da região codificadora de AHAS de Arabidopsis

(a) Preparação de molde de cadeia simples de pAC301 - o plasmídeo pAC301 foi usado para transformar E. coli estirpe XL-1 (Stratagene). O molde de cadeia simples de pAC301 foi gerado a partir desta construção do "fagemídeo" pSK(-) seguindo o protocolo do fabricante. De rotina, uma cultura de 3 ml SB_{amp} crescida durante a noite foi adicionada a um frasco estéril contendo 50 ml de SB_{amp} (SB é 35 g de bacto-triptona, 20 g de extracto de levedura, 5 g de NaCl e 10 ml de 1M Tris-HCl, pH 7,5 por litro) e incubado a 37°C com agitação constante (300 rpm) até a cultura atingir uma DO600 de 0,3. Nesta altura a cultura foi inoculada com o fago auxiliar, R408 (1×10^{10} fagos) e fez-se agitação a 300 rpm, 10°C, durante a noite. As bactérias foram sedimentadas a 10 000 xg durante 10 minutos. O sedimento de bactérias foi rejeitado e o sobrenadante (aproximadamente 45 ml) contendo o molde de cadeia simples pAC301 foi guardado a 4°C até ser usado. O



sobrenadante foi de rotina usado durante até cerca de um mês para preparações de fagemídeos de cadeia simples. As preparações em pequena escala (1,2 ml) de DNA do fagemídeo de cadeia simples pAC301 foram preparadas essencialmente como descrito pelo fabricante (Stratagene). Os fagos foram precipitados pela adição de 300 μ l de uma solução 3,5 M NH_4Ac , pH 7,5; 20% PEG. A solução foi bem misturada num tubo Eppendorff e incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos. O fago de cadeia simples foi sedimentado por centrifugação durante 20 minutos numa microcentrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi decantado, o sedimento seco e eventualmente ressuspense em 300 μ l de tampão TE. Os fagos foram lisados pela adição de 200 μ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e sujeito a vortex durante 1 minuto. Este passo foi repetido uma vez mais e seguido de mais duas extracções com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa final foi precipitada com etanol (um décimo do volume de 5M K^+ /3M OAc e dois volumes de 100% etanol), lavada com etanol a 70%, ressuspensa em 20 μ l de tampão TE e transferido para um tubo novo Eppendorf de 1,5 ml.

(c) Preparação do oligonucleótido - Todos os oligonucleótidos foram adquiridos à New England Biolabs. Os oligonucleótidos foram utilizados para introduzir (1) uma substituição de aminoácidos no resíduo Trp574 da região codificadora de AHAS de Arabidopsis (Trp --> Leu) e (2) uma deleção de aminoácidos no resíduo de aminoácidos Trp574.

Substituições Trp --> Leu

	V	M	Q	W	E	D	R
selvagem	5'-GTT ATG CAA TGG GAA GAT CGG-3'						

	V	M	Q	L	E	D	R
mutante	5'-GTT ATG CAA TTG GAA GAT CGG-3' (21-meros)						

Deleção Trp574

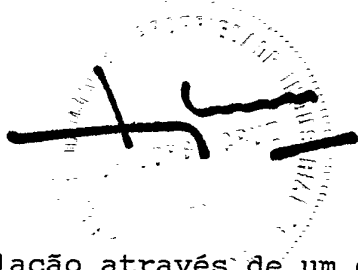
V M Q W E D R

selvagem 5'-GTT ATG CAA TGG GAA GAT CGG-3'

V M Q E D R

mutante 5'-G GTT ATG CAA --- GAA GAT CGC-3' (21 meros)

Duzentas nanogramas de cada um dos oligonucleótidos foi sujeito a uma reacção de permuta com cinase antes da hibridação com o molde de cadeia simples pAC301. Um volume de reacção de 40 μ l incluiu 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 0,1 mM espermidina e 0,1 mM Na_2 -EDTA. A reacção foi iniciada via adição de 10 unidades de polinucleótido-cinase de T4 (Pharmacia) e foi incubada a 37°C durante 30 minutos. A reacção foi parada levando a mistura de reacção a 90°C durante 3 minutos. Metade da reacção com cinase foi adicionada a 20 μ l de preparação de cadeia simples de pAC301 e foi incubado a 65°C durante 10 minutos para promover a hibridação. A estes 40 μ l de mistura cinase/oligonucleótidos adicionou-se 6 μ l de 1mM dNTPs, 6 μ l de tampão ligase 10x (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 70 mM $MgCl_2$ e 1'0 mM DTT), 2 μ l rATP, 5 unidades de DNA-polimerase Klenow (Pharmacia), 8 unidades de DNA-ligase (Stratagene) e 4 μ l de água destilada. A reacção polimerase/ligação foi incubada à temperatura ambiente durante 3 horas. Metade da mistura foi usada para transformar células competentes E. coli XL-1. A mistura de transformação foi espelhada em placas LB_{amp} e incubada durante a noite a 37°C. Os transformantes foram novamente semeados em placas frescas LB_{amp} segundo um padrão tipo grelha. O despiste de colónias por hibridação foi realizado exactamente como descrito por Stratagene Technical service (Junho 1988/pBSII Exo/Mung Bean Sequencing System). Ambos os oligonucleótidos foram marcados com ³²P por uma reacção de permuta com cinase (300 ng de oligonucleótido na presença de 40 μ Ci de gama³²P-ATP utilizando as condições de cinase anteriormente descritas). O ³²P-ATP não incorporado foi removido por



electroforese da reacção de fosforilação através de um gel de 20% acrilamida/7M ureia. A banda radioactiva correspondendo a um oligonucleótido de 21-meros foi cortada do gel com uma lâmina de barbear e eluida por (1) método de esmagamento e embebição de Maxam e Gilbert (PNAS USA 74: 560-566, 1977) ou (2) electroeluição usando um sistema de electroeluição IBI. Os oligonucleótidos marcados radioactivamente e purificados foram hibridados com colónias transferidas para filtros de nitrocelulose em condições de hibridação não restritivas (37°C durante 24 horas em 6xSSC, 5 x solução de Denhardt, 50 mM Na-P, pH 7,2 e 500 µg/µl de DNA de timo de vitela). Os filtros foram lavados uma vez à temperatura ambiente em 6xSSC e 50 mM Na-P, pH 7,2 e novamente a 37°C em 6xSSC e 50 mM Na-P, pH 7,2. Finalmente, os filtros foram lavados duas vezes a 60°C durante 15 minutos em cloreto de tetrametilamónio 3M, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM Na₂-EDTA e 1mg/ml de SDS. Um oligonucleótido de 21-meros com um emparelhamento de bases perfeito (i.e. oligo mutante para fagemídeo mutante) não se liberta do DNA de fagemídeo a 60°C, enquanto que um ligeiro desemparelhamento (i.e. oligo mutante para fagemídeo selvagem) é removido. Os positivos putativos foram semeados a partir da placa LB_{amp} original para uma placa LB_{amp} fresca. Dez transformantes de cada um dos positivos putativos novamente semeados foram então semeados segundo um padrão tipo grelha e repetida a hibridação de colónias. Os positivos secundários foram então confirmados via análise de sequências de DNA na região codificadora de Trp574. (Sanger et al., PNAS VSA 74: 5463-5467, 1977). Dois mutantes positivos, pAC324 (substituição Trp574 --> Leu) e pAC325 (deleção Trp574) foram seleccionados para posterior análise.



EXEMPLO III

Transformação de Tabaco Mediada por Agrobacterium

(a) Construção de vectores - Ambos os vectores e a estirpe de Agrobacterium foram adquiridas à Clontech. O plasmídeo pBIN19 é um vector vai-vem binário E. coli/Agrobacterium que possui as sequências delimitantes de T-DNA do plasmídeo Ti, um poliadaptador e uma origem de replicação bacteriana RK2 funcional tanto em E. coli como em Agrobacterium e um gene que confere resistência à canamicina (Bevan, Nucl. Acids Res. 12:8711-8721, 1984). Os plasmídeos pAC324 e pAC325 foram digeridos com XbaI e sujeitos a electroforese num gel de 1% de agarose. O fragmento XbaI de 5,5 Kb contendo a respectiva mutação de pAC324 e pAC325 foi isolado como anteriormente descrito. O plasmídeo pBIN19 foi digerido com XbaI e incubado numa reacção de ligação separada com o fragmento XbaI de 5,5 Kb do pAC324 e pAC325. Toda a mistura de ligação foi usada para transformar células E. coli XL-1 e os transformantes positivos foram escolhidos por selecção de cor branco/azul em placas LB_{aix} (placas LB com 100 µg/ml de ampicilina, 80 µg/ml de X-gal e 20 mM IPTG). As preparações de plasmídeo em pequena escala, análise por digestão com enzimas de restrição e electroforese em gel de agarose para confirmar os transformantes positivos foram realizadas como descrito anteriormente. Das quatro construções de plasmídeo baseadas em pBIN19, pAC348-pAC349 (ambas as orientações do fragmento XbaI de 5,5 Kb contendo a substituição Trp-->Leu em pBIN19) e pAC350-pAC351 (ambas as orientações do fragmento XbaI de 5,5 Kb contendo a deleção Trp574 em pBIN19), uma construção de cada mutação foi escolhida para transformação de tabaco.

(b) Mobilização de pAC348 - pAC351 para Agrobacterium

O plasmídeo pRK2013 é um plasmídeo de conjugação que contém sequências que actuam em trans necessárias para mobilizar construções baseadas em pBIN19 de E. coli para Agrobacterium estirpe LB4404 (pAL4404). Esta estirpe de Agrobacterium é resistente à estreptomicina e contém o plasmídeo pAL4404 sem braços Ti (Ooms et al., Plasmid 7: 15-29, 1982) este plasmídeo Ti contribui para as funções de transactuação de virulência necessárias para facilitar a transferência da região de T-DNA baseado em pBIN19 para o cromossoma de tabaco. A conjugação triparental dos vectores baseados em pBIN19, o plasmídeo conjugativo (pRK2013) e a estirpe de Agrobacterium (LBA4404), foram realizados essencialmente como descrito por Bevan (Nucl. Acids Res. 12: 8711-8721, 1984). Os plasmídeos pAC348-351 (Kan_r) e pRK2013 (Kan_r) e pRK2013 (Kan_r) foram usados para transformar células competentes de E. coli HB101 ou XL-1 como descrito anteriormente. Os transformantes contendo cada um dos plasmídeos foram inoculados em culturas de 3 ml de caldo de LB_{kan} e incubados a 37°C com agitação constante. Agrobacterium estirpe LBA4404 foi inoculado em meio AB_{estr} (20 x AB é 20g NH₄Cl, 6g MgSO₄-7H₂O, 3g KCl, 60 g K₂HPO₄, 20g NAH₂PO₄, 3g CaCl₂ e 50 mg FeSO₄-7H₂O. A glucose é adicionada de um stock 1x para uma concentração final de 0,5x) e incubado com agitação constante a 28°C durante 36-48 hr. A conjugação triparental é iniciada por combinação de 1 ml de cada uma das três culturas (uma construção baseada em pBIN19, pRK2013 e LBA4404) num tubo estéril e continuação da incubação a 28°C durante 1 hr. A cultura foi concentrada via vácuo através de um filtro 0,45 µm e incubada durante a noite a 28°C numa placa NB (NB é 4g de pó de caldo nutriente Difco e 10 ml de 1M Tris-HCl, pH 7,2). O filtro foi colocado em 2 ml de meios AB frescos e rodado lentamente durante 1 hora. Uma série de diluições foi espalhada em placas AB_{estre/can} e incubada a 28°C durante 3-4 dias. Apenas Agrobacterium (estre_r) portadora da construção baseada em pBIN19 (can_r) cresceu em meio AB_{estrep/can}. Colónias isoladas a partir de placas

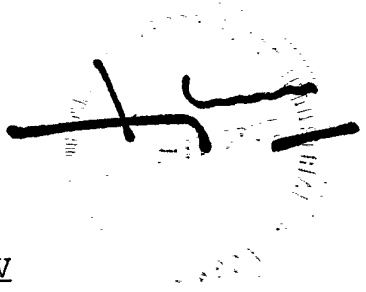
AB_{estrep/can} foram inoculadas em caldo AB_{estrep/can} e incubadas a 28°C com agitação constante durante 36-48 horas. Estas culturas foram novamente inoculadas em placas AB_{estrep/can'} incubadas a 28°C durante 3-4 dias e guardadas a 4°C até serem usadas.

(c) Transformação de tabaco mediada por *Agrobacterium*

pAC348 e pAC351 foram inoculadas em 50 ml de AB_{can} e incubadas com agitação constante a 28°C durante 36-48 horas. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos numa centrífuga de bancada Damon/IEC. O sedimento de bactérias foi ressuspensão em 5 ml de meio BAT (meio BAT é 1x sais MS (Murashige e Skoog, Plant Physiol. 15: 473-497, 1962) 1x vitaminas B₅ [100x B₅ é 10 mg de mio-inositol, 100 mg de ácido nicotínico, 100 mg de piridoxina-HCl e 1000mg de Tiamina-HCl por 1 litro], 3% sucrose, 5 µM 6-benzilaminopurina a pH 5,7). Folhas jovens de tabaco Wisconsin 38 crescidas em estufa foram cortadas em 2 secções longitudinais e embebidas em água quente contendo sabão de mãos Ivory. As secções de folhas foram lavadas em água destilada estéril, embebidas numa solução a 10% de Clorox + Tween 20 durante 10 minutos com agitação e lavadas com H₂O destilada. Os discos foram cortados das secções de folha usando uma furadeira de cortiça ou punção de buracos. Estes discos são colocados num tubo de 50 ml contendo a cultura de *Agrobacterium* ressuspensa. A suspensão foi misturada suavemente durante 5 min e enxuta sobre uma toalha de papel estéril e cultivada em placas de meio BAT (100 placas de 200 mm com aproximadamente 10 discos por placa). As placas foram incubadas a 25°C com luz fluorescente durante 48 horas. Os discos foram então transferidos para meio de selecção (BATCK; meio BAT mais carbenicilina e canamicina) e voltaram para as condições de incubação iniciais até à formação de rebentos. Os rebentos resistentes à canamicina foram transferidos para meio de selecção OTCK (enraizamento) (o meio OTCK é

meio BATCK menos 6-benzilaminopurina) em caixas de Magenta (GA7) e continuaram as condições de incubação anteriormente descritas. Quando os rebentos resistentes à canamicina formaram um sistema radicular apreciável (pelo menos 3 raízes com comprimentos superiores a 1cm), as plantas foram transferidas para o solo. Resumidamente, o rebento baseado em agar foi removido da caixa GA7, o agar foi cuidadosamente removido por lavagem com água da torneira quente e os rebentos foram transferidos para metromix em potes de turfa em vasos GA7. As plantas foram colocadas na estufa e deixadas a fortalecer. Um total de 5 rebentos resistentes à canamicina contendo pAC348 e 9 rebentos resistentes à canamicina contendo pAC350 foram transferidos para o solo. Aproximadamente 10-14 dias mais tarde, os potes de turfa foram transplantados para potes maiores.

pAC348	pAC351
<u>Transformante #:</u>	<u>Transformante #:</u>
1) 19-1	1) 10-1
2) 33-1	2) 20-1
3) 33-1	3) 20-2
4) 46-1	4) 20-3
5) 46-2	5) 27-1
	6) 27-2
	7) 27-3
	8) 30-1
	9) 42-4



EXEMPLO IV

Determinação e Caracterização de Mutantes que Conferem Resistência a Herbicidas

Ensaio da enzima AHAS (tecido foliar) - Pouco após a transferência para a estufa, prepararam-se extractos de cada um dos transformantes resistentes à canamicina e testaram-se relativamente à insensibilidade ao herbicida imidazolinona Pursuit^R. A aceto-hidroxiácido-sintetase foi extraída e testada como descrito na secção anterior. Dois transformantes resistentes à canamicina (33-1 e 46-2) que contêm o alelo mutante da substituição Trp574-->Leu do alelo AHAS de *Arabidopsis* apresentam actividade AHAS na presença do herbicida Pursuit^R. Em adição, a actividade de AHAS de um transformante de deleção resistente à canamicina (10-1) apresenta insensibilidade à adição do herbicida Pursuit^R (Figura 7). Este transformante de deleção Trp574 foi autocruzado e cruzado com progenitores Wisconsin 38. A progénie de 10-1 apresenta tolerância a aplicações pós-emergência do herbicida Pursuit^R 4-8x superior à concentração letal para plantas do tabaco testemunha.

As Figuras 2(a)-(c) mostram comparações fotográficas dos fenótipos dos cruzamentos e testemunhas discutidas atrás. Estas observações indicam a herança da resistência observada no ensaio AHAS inicial de tecido foliar transformado e expressão desta característica a nível de planta completa.

Num ensaio mais quantitativo, sementes de progénie do autocruzamento do tabaco transgénico (10-1) contendo a mutação de deleção Trp574 de AHAS *Arabidopsis* assim como sementes do cultivar parental susceptível "Wisconsin 38" foram semeadas em Metro Mix 350^R em vasos Azalea de 5 polegadas. As plantas derivadas das

sementes espalhadas após dois dias para fortalecimento. Onze dias mais tarde, estas plantas foram vaporizadas após emergência com Pursuit^R a 0, 10, 20, 40, 80 e 160 g/ha. Cinco plantas de cada tipo de tabaco (transgênicas e testemunha) foram vaporizadas para cada concentração de herbicida. Tween 20TM foi adicionado a 0,25 v/v às soluções de herbicida antes da vaporização. O herbicida foi aplicado com um vaporizador de laboratório de correia numa concentração de 400l/ha a uma distância de 18 polegadas acima das plantas com uma velocidade de correia de 8,2 seg/rev e bocal de vaporizador #65015E. As alturas das plantas foram medidas 1, 2, 3, e 4 semanas após o tratamento, os dados do peso fresco das plantas foram colhidos às quatro semanas e meia.

Os resultados destas vaporizações estão descritos na Figura 4. Os resultados da progênie no gráfico estão apresentados com o indivíduo mais tolerante em primeiro lugar e o indivíduo mais susceptível em último lugar para cada concentração de herbicida. Como se pode ver por este gráfico e como seria de esperar de uma progênie de autocruzamento da planta transgênica original, a progênie é segregada relativamente à tolerância ao herbicida. Podem ser observados tanto a progênie susceptível como os indivíduos com vários graus de tolerância ao herbicida.

Os pesos frescos das plantas (g) e médias para cada concentração de herbicida estão apresentados na Tabela 2 com os pesos frescos médios (g) resumidos abaixo (Tabela 1):

Tabela 1

<u>Peso Fresco médio do tabaco:</u> (5 reps cada)	<u>Testemunha</u>	<u>Progénie Transgênica</u>
Concentração de herbicida:		
0 g/ha	52,1	53,7
10 g/ha	8,1	36,4
20 g/ha	2,0	28,8
40 g/ha	0,8	20,9
80 g/ha	0,6	26,5
160 g/ha	0,2	21,4

Como se pode ver por esta tabela, a progénie autocruzada da planta do tabaco transgênica (10-1) apresentou um elevado grau de tolerância ao Pursuit^R aplicado após emergência. O cultivar parental susceptível não apresenta tolerância aos herbicidas em qualquer uma das concentrações usadas.

As sementes resultantes da planta transgênica 10-1 foram também testadas quanto à resistência à imidazolinona Pursuit^R. As sementes foram semeadas em meio contendo Pursuit^R a 0, 1,25, 2,5, 3,75 e 5,0 μM . Vinte sementes foram semeadas por placa de Petri com duas placas por tratamento. A tolerância aos herbicidas das plantas derivadas de sementes foi avaliada três semanas mais tarde. Os resultados do tratamento com 5,0 μM estão apresentados na Tabela 2. mesmo na concentração mais baixa (tratamento com 1,25 μM), as plantas testemunha apresentam sensibilidade ao herbicida. Estes resultados ilustram a hereditariedade da característica de resistência a herbicidas da planta parental 10-1 para a sua progénie.

Tabela 2

Resultados do ensaio com sementes do tabaco

Concentração de Pursuit ^R : 5		S*	D	R
Progênie:	W38 (selvagem)	20	0	0
		20	0	0
	10-1 autocruzada	7	6	6
		3	11	6
	10-1 x 0	11	9	0
		11	9	0
	0 x 10-1	10	9	0
		8	8	0

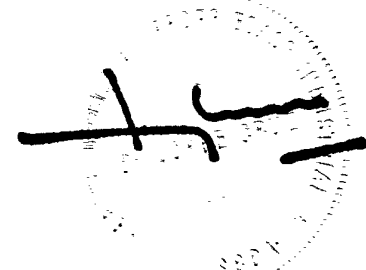
* S = Susceptível; D = Danificado; R = Resistente

EXEMPLO VEnsaio Enzimático de AHAS em E. coli

Ensaio com enzima AHAS (expressão em E. coli) - Os mutantes dirigidos, pAC224 e pAC225, foram utilizados como moldes para a geração de um sistema de expressão baseado em E. coli. A insensibilidade ao herbicida foi testada quando o gene da planta superior com interesse é expresso numa estirpe bacteriana sem qualquer actividade AHAS endógena. Com esta finalidade, o fragmento NcoI/PstI de AHAS de Arabidopsis selvagem (pAC301), a

substituição Trp574-Leu (pAC224) e a deleção Trp574 (pAC225) foram subclonados no sítio NcoI/PstI do vector de expressão de E. coli, pKK233-2 (adquirido à Pharmacia). Este plasmídeo de expressão contém um promotor induzível IPTG assim como uma sequência de terminação da transcrição. Ambas as regiões rodeiam uma sequência de adaptadores NcoI, HindIII e PstI que permite a orientação correcta do gene com interesse em relação ao promotor bacteriano. A subclonagem e ligação dos respectivos fragmentos NcoI/PstI no DNA de pKK233-2 digerido com NcoI/PstI (resistência à ampicilina) foi como anteriormente descrito. A reacção de ligação foi usada para transformar E. coli estirpe MF2000 [ilvB800:mu-1, Bg132, ilvI15, thi-1, argE3, RPSL31, (ara-leu, ilvHI) 863, mtl-1, xyl-5, galK2, lacYI, recA1]. Esta estirpe bacteriana não possui actividade endógena de AHAS. Portanto, o crescimento num meio mínimo sem isoleucina e valina (os produtos finais da via de biossíntese de aminoácidos na qual a enzima AHAS está envolvida) numa estirpe MF2000 transformada com pAC224 (trp574-Leu) ou pAC225 (Trp del) requiere a expressão e função do gene de Arabidopsis em E. coli. Cada uma das três construções complementa MF2000 em meio com agar assim como em culturas em caldo.

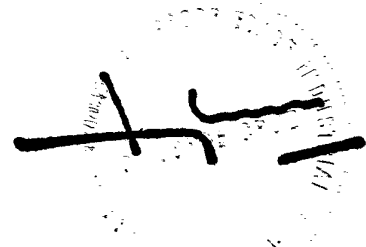
Colónias isoladas de MF2000 contendo a construção de plasmídeo pAC210, pAC224 ou pAC225 foram inoculadas em culturas em caldo de 3 ml de meio mínimo M63 (amp) contendo os aminoácidos arginina, leucina, isoleucina e valina. [M63 é 30 g de KH_2PO_4 , 70g de K_2HPO_4 , 20 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mg de FeSO_4 , 100 μl de 1M MgSO_4 , 200 μl de tiamina. A concentração de glucose foi aumentada para 1,2%]. As culturas foram incubadas durante a noite a 37°C com agitação constante. As células bacterianas foram sedimentadas, ressuspensas em vários ml de M63 (amp) suplementado com arginina e leucina, mas sem isoleucina e valina (meio ilv menos). As células foram transferidas para 10-50 ml de meio ilv menos e agitação constante a 37°C continuou durante a noite. As células



foram sedimentadas e usadas directamente em ensaios enzimáticos de AHAS ou congeladas a -20°C até serem usadas.

A extracção e ensaio de AHAS de Arabidopsis em células bacterianas foi essencialmente como descrito por Singh, et al., (J. Chromatography 444: 251-261, 1988). O sedimento de bactérias foi reduzido a pó em azoto líquido e homogenizado em tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo piruvato 10 mM, cloreto de magnésio 5 mM, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 5 mM, flavina-adenina-dinucleótido (FAD) $100\mu\text{M}$, valina 1mM, leucina 1mM, 10% (v/v) de glicerol e cisteína 10mM. O homogenato foi filtrado através de um filtro de nylon ($53\mu\text{M}$ mesh) e centrifugado a 25000 xg durante 20 minutos. A fracção de sobrenadante foi levada a 50% de saturação relativamente a sulfato de amónio e deixou-se em repouso durante 20-30 minutos em gelo. O precipitado foi sedimentado via centrifugação a 25000 xg durante 20 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento de sulfato de amónio foi usado imediatamente ou congelado com azoto líquido e guardado a -20°C até ser usado.

A actividade AHAS na presença ou ausência de herbicida foi medida por cálculo do produto acetolactato, após conversão por descarboxilação ácida para acetoína. As misturas de reacção convencionais contêm a enzima (e herbicida) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo piruvato de sódio 100 mM, cloreto de magnésio 10 mM, pirofosfato de tiamina (TPP) 1mM e FAD $10\mu\text{M}$. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 1 hr. A reacção foi parada com a adição de ácido sulfúrico para dar uma concentração final de 0,85%. O produto de reacção foi deixado a descarboxilar a 60°C durante 15 minutos. A acetoína formada foi determinada por incubação com creatina (0,17%) e 1-naftol (1,7%) pelo método de Westerfeld (J. Biol. Chem. 161:495-502, 1945). Durante os ensaios das enzimas foram feitos os testes adequados da formação directa de acetoína.

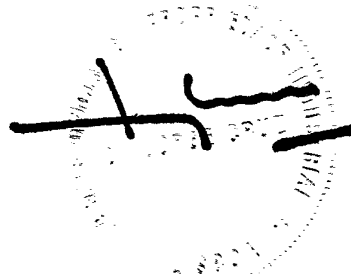

 AHAS selvagem de Arabidopsis (pAC201) é sensível ao herbicida imidazolinona Pursuit^R e o herbicida sulfonilureia Glean^R enquanto tanto a substituição Trp574-Leu como a deleção Trp574 (pAC225) são insensíveis a concentrações crescentes do herbicida Pursuit^R (Figura 4) e do herbicida Glean^R (Figura 5). Surpreendentemente, a deleção confere um nível de insensibilidade a estes herbicidas que é equivalente ou superior ao da correspondente substituição. Portanto, a deleção do resíduo Trp574 da região codificadora de AHAS de Arabidopsis resulta numa forma funcional da enzima que é insensível à adição de dois herbicidas não relacionados capazes de inibir a forma selvagem da enzima.

Os processos referidos atrás também são usados para criar substituição de uma arginina por uma serina na posição 653, assim como uma deleção nesta posição. Os plasmídeos contendo a substituição (pAC229) ou a deleção (pAC230) foram usados para transformar E. coli MF2000 e é determinada a actividade de AHAS dos mutantes de deleção e substituição na presença de herbicidas Pursuit^R e Glean^R para cada um como descrito atrás. O AHAS produzido por substituição de asparagina por serina é insensível à inibição por Pursuit^R (Figura 6) como anteriormente descrito (Sathasivan et al., supra), mas sensibilidade a Glean^R foi apenas ligeiramente reduzida (cerca de 10%) comparado com a enzima selvagem (Figura 7). Pelo contrário, a AHAS produzida pela deleção Ser653 é altamente resistente à inibição por Pursuit^R e Glean^R (Figuras 6 e 7).

DEPÓSITOS DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Os microorganismos que se seguem foram depositados na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20857, em 6 de Dezenmbro, 1990 e dado os números de acesso como se segue:

<u>Microorganismo</u>	<u>Nº de Acesso</u>
<u>Agrobacterium</u> estirpe LBA4404 portadora de pAC351 (Agro/351) [deleção Trp574]	68488
<u>Agrobacterium</u> estirpe LBA4404 portadora do plasmídeo pAC324 [deleção Ser653]	68489



REIVINDICAÇÕES:

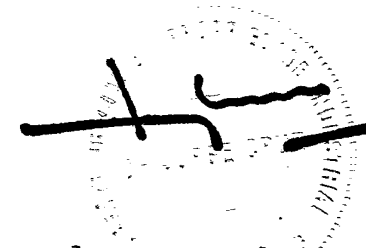
1ª. - Método para a expressão de uma enzima sintetase de aceto-hidroxiácidos (AHAS) resistente a herbicidas numa célula hospedeira, caracterizado por compreender a transformação da célula hospedeira com uma sequência de ácido nucleico codificado-ra de uma enzima AHAS funcional, enzima essa que tem uma sequência de aminoácidos a qual difere da da sequência de AHAS tipo selvagem por ter pelo menos uma deleção de aminoácidos que confere à enzima resistência a herbicida, e a cultura da célula hospedeira em condições que permitem a expressão da enzima.

2ª. - Método de acordo com a Reivindicação 1 caracterizado por se encontrar presente uma deleção numa região conservada da sequência AHAS.

3ª. - Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-2, caracterizado por ocorrer uma deleção numa região da sequência tipo selvagem de AHAS de Arabidopsis seleccionada de entre o grupo constituído pelos aminoácidos 119-122, 194-197, 201-208, 255-257, 348-353, 373-377, 569-578 e 650-653, ou as regiões homólogas numa espécie diferente.

4ª. - Método de acordo com as Reivindicações 1-3, caracterizado por a deleção ocorrer em pelo menos uma posição seleccionada de entre o grupo constituído pelos aminoácidos 121, 122, 197, 205, 256, 351, 376, 571, 574, 578 e 653.

5ª. - Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4, caracterizado por a resistência ser a pelo menos um herbicida seleccionado de entre o grupo constituído por uma imidazolinona, uma sulfonilureia e uma triazolopirimidina.



6ª. - Método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-5, caracterizado por a célula hospedeira ser uma célula vegetal.

7ª. - Método de acordo com a Reivindicação 6, caracterizado por a célula vegetal transformada ser regenerada para dar uma planta madura expressando um fenótipo de resistência a herbicidas.

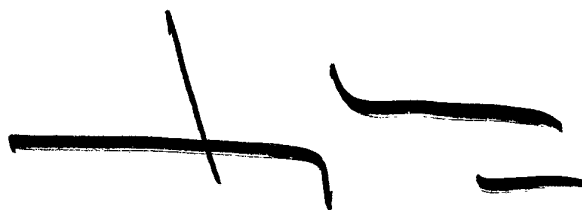
8ª. - Método para a produção de um vector útil para conferir resistência a herbicidas a uma célula hospedeira, caracterizado por compreender a ligação num vector adequado de uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma enzima AHAS funcional, enzima essa que tem uma sequência de aminoácidos diferindo da AHAS tipo selvagem por ter pelo menos uma deleção de aminoácidos que confere à enzima resistência a herbicidas.

9ª. - Método para conferir resistência a herbicidas a uma célula vegetal, caracterizado por se fornecer à célula vegetal uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma enzima AHAS funcional, enzima essa que tem uma sequência de aminoácidos que difere de uma sequência AHAS tipo selvagem por ter pelo menos uma deleção de aminoácidos que confere à enzima resistência a herbicidas.

10ª. - Método para o crescimento de plantas resistentes a herbicidas, caracterizado por compreender a cultura de uma planta que produz uma enzima AHAS funcional com uma sequência de aminoácidos que difere da sequência tipo selvagem de AHAS por ter pelo menos uma deleção de aminoácidos que confere à enzima resistência a herbicidas, na presença de uma quantidade inibidora do herbicida.

11ª. - Método de selecção de células hospedeiras transformadas com êxito com um gene de interesse, caracterizado por se fornecer às células hospedeiras prospectivas o gene com interesse ligado a uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma enzima AHAS funcional, enzima essa que tem uma sequência de amnoácidos que difere da sequência AHAS tipo selvagem por ter pelo menos uma deleção de aminoácidos que confere à enzima resistência a herbicidas, crescimento das células na presença de uma quantidade inibidora de um herbicida e identificação das células sobreviventes como contendo o gene com interesse.

Lisboa 20 de Dezembro de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser
1 5 10

Ser Ile Ser Phe Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser
15 20

Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser Arg Phe Ser Leu
25 30 35

Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
40 45

Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser
50 55 60

Ser Ile Ser Ala Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val
65 70

Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys Pro Thr Lys Pro
75 80

Glu Thr Phe Ile Ser Arg Leu Ala Pro Asp Gln Pro
85 90 95

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu
100 105

Arg Gln Gly Val Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly
110 115 120

Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg
125 130

Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
135 140

Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg
145 150 155

Ser Ser Gly Lys Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser
160 165

Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala
170 175 180

Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile
185 190

Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp
195 200

Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg
205 210 215

FIG.1a(i)

Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met Asp Val
220 225

Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe
230 235 240

Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val
245 250

Asp Val Pro (Lys) Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile
255 260

Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg Leu Pro Gly Tyr
265 270 275

Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His
280 285

Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys
290 295 300

Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn
305 310

Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe Val Glu Leu Thr
315 320

Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly
325 330 335

Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met
340 345

Leu Gly (Met) His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala
350 355 360

Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val
365 370

Arg Phe Asp (Asp) Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
375 380

Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile
385 390 395

Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His
400 405

Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln
410 415 420

Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu
425 430

FIG.1a(ii)

Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu
435 440

Asn Val Gln Lys Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys
445 450 455

Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile
460 465

Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile
470 475 480

Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala
485 490

Ala Gln Phe Tyr Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp
495 500

Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly
505 510 515

Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
520 525

Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser
530 535 540

Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg
545 550

Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Leu Leu Leu Asn
555 560

Asn Gln His Leu Gly Met (Val) Met Gln (Trp) Glu Asp
565 570 575

Arg (Phe) Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu
580 585

Gly Asp Pro Ala Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn
590 595 600

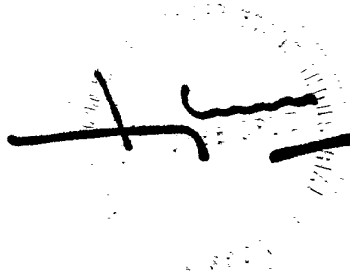
Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys Gly Ile Pro Ala
605 610

Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
615 620

Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu
625 630 635

Leu Asp Val Ile Cys Pro His Gln Glu His Val Leu
640 645

FIG.1a(iii)



Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asp Val
650 655 660
Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr
665 670

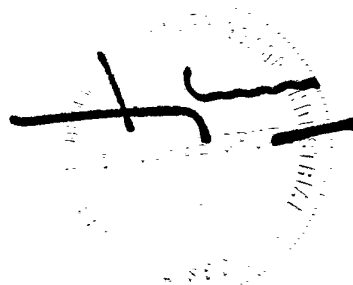
FIG.1a(iiii)

NTRAAARAAA GAAAGAAAGA TCAATTTGAT AAATTTCTCA 40
GCCACAAATT CTACATTTAG GTTTTAGCAT ATCGAAGGCT 80
CAATCACAAA TACAATAGAT AGACTAGAGA TTCCAGCGTC 120
ACGTGAGTTT TATCTATAAA TAAAGGACCA AAAATCAAAT 160
CCCGAGGGCA TTTTCGTAAT CCAACATAAA ACCCTTAAAC 200
TTCAAGTCTC ATTTTAAAC AAATCATGTT CACAAGTCTC 240
TTCTTCTTCT CTGTTTCTCT ATCTCTTGCT CATCTTTCTC 280
CTGAACCATG GCGGCGGCAA CAACAACAAC AACAACATCT 320
TCTTCGATCT CCTTCTCCAC CAAACCATCT CCTTCCTCCT 360
CCAAATCACC ATTACCAATC TCCAGATTCT CCCTCCCATT 400
CTCCCTAAAC CCAACAAAT CATCCTCCTC CTCCCGCCGC 440
CGCGGTATCA AATCCAGCTC TCCCTCCTCC ATCTCCGCCG 480
TGCTCAACAC AACCACCAAT GTCACAACCA CTCCCTCTCC 520
AACCAAACCT ACCAAACCCG AAACATTCAT CTCCCGATTG 560
GCTCCAGATC AACCCCGCAA AGGCGCTGAT ATCCTCGTCG 600
AAGCTTTAGA ACGTCAAGGC GTAGAAACCG TATTCGCTTA 640
CCCTGGAGGT GCATCAATGG AGATTCACCA AGCCTTAACC 680
CGCTCTTCCT CAATCCGTAA CGTCCTTCCT CGTCACGAAC 720
AAGGAGGTGT ATTGCAGCA GAAGGATACG CTCGATCCTC 760
AGGTAAACCA GGTATCTGTA TAGCCACTTC AGGTCCCGGA 800
GCTACAAATC TCGTTAGCGG ATTAGCCGAT GCGTTGTTAG 840
ATAGTGTTCC TCTTGTAGCA ATCACAGGAC AAGTCCCTCG 880
TCGTATGATT GGTACAGATG CGTTTCAAGA GACTCCGATT 920
GTTGAGGTAA CGCGTTCGAT TACGAAGCAT AACTATCTTG 960
TGATGGATGT TGAAGATATC CCTAGGATTA TTGAGGAAGC 1000
TTTCTTTTAA GCTACTTCTG GTAGACCTGG ACCTGTTTTG 1040
GTTGATGTTT CTAAAGATAT TCAACAACAG CTTGCGATTC 1080

FIG.Ib(i)

CTAATTGGGA ACAGGCTATG AGATTACCTG GTTATATGTC 1120
TAGGATGCCT AAACCTCCGG AAGATTCTCA TTTGGAGCAG 1160
ATTGTTAGGT TGATTTCTGA GTCTAAGAAG CCTGTGTTGT 1200
ATGTTGGTGG TGGTTGTTG AATTCTAGCG ATGAATTGGG 1240
TAGGTTTGTG GAGCTTACGG GGATCCCTGT TCGAGTACG 1280
TTGATGGGGC TGGGATCTTA TCCTTGATGAT GATGAGTTGT 1320
CGTTACATAT GCTTGAATG CATGGGACTG TGTATGCAAA 1360
TTACGCTGTG GAGCATAGTG ATTTGTTGTT GCGTTTGGG 1400
GTAAGGTTTG ATGATCGTGT CACGGGTAAG CTTGAGGCTT 1440
TTGCTAGTAG GGCTAAGATT GTTCATATTG ATATTGACTC 1480
GGCTGAGATT GGAAGAATA AGACTCCTCA TGTGTCTGTG 1520
TGTGGTGATG TTAAGCTGGC TTGCAAGGG ATGAATAAGG 1560
TTCTTGAGAA CCGAGCGGAG GAGCTTAAGC TTGATTTTGG 1600
AGTTTGGAGG AATGAGTTGA ACGTACAGAA ACAGAAGTTT 1640
CCGTTGAGCT TTAAGACGTT TGGGGAAGCT ATTCCTCCAC 1680
AGTATGCGAT TAAGGTCCTT GATGAGTTGA CTGATGGAAA 1720
AGCCATAATA AGTACTGGTG TCGGGCAACA TCAAATGTGG 1760
GCGGCGCAGT TCTACAATTA CAAGAAACCA AGGCAGTGGC 1800
TATCATCAGG AGGCCTTGGA GCTATGGGAT TTGGACTTCC 1840
TGCTGCGATT GGAGCGTCTG TTGCTAACCC TGATGCGATA 1880
GTTGTGGATA TTGACGGAGA TGGAAGCTTT ATAATGAATG 1920
TGCAAGAGCT AGCCACTATT CGTGTAGAGA ATCTTCCAGT 1960
GAAGGTACTT TTATTAAACA ACCAGCATCT TGGCATGGTT 2000
ATGCAATGGG AAGATCGGTT CTACAAAGCT AACCGAGCTC 2040
ACACATTTCT CGGGGATCCG GCTCAGGAGG ACGAGATATT 2080
CCCGAACATG TTGCTGTTTG CAGCAGCTTG CGGGATTCCA 2120
GCGGCGAGGG TGACAAAGAA AGCAGATCTC CGAGAAGCTA 2160

FIG.1b(ii)



TTCAGACAAT GCTGGATACA CCAGGACCTT ACCTGTTGGA	2200
TGTGATTTGT CCGCACCAAG AACATGTGTT GCCGATGATC	2240
CCGAGTGGTG GCACTTTCAA CGATGTCATA ACGGAAGGAG	2280
ATGGCCGGAT TAAATACTGA GAGATGAAAC CGGTGATTAT	2320
CAGAACCTTT TATGGTCTTT GTATGCATAT GGTAACAAAA	2360
CTTAGTTTGC AATTTCCCTGT TTGTTTTGGT AATTTGAGTT	2400
TCTTTTAGTT GTTGATCTGC CTGCTTTTTG GTTTACGTCA	2440
GACTACTACT GCTGTTGTTG TTTGGTTTCC TTTCTTTCAT	2480
TTTATAAATA AATAATCCGG TTCGGTTTAC TCCTTGTGAC	2520
TGGCTC	2526

FIG.Ib(iii)

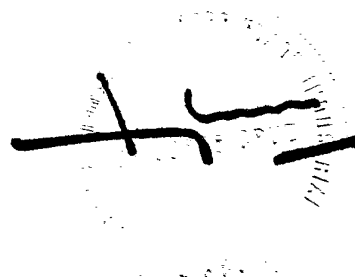
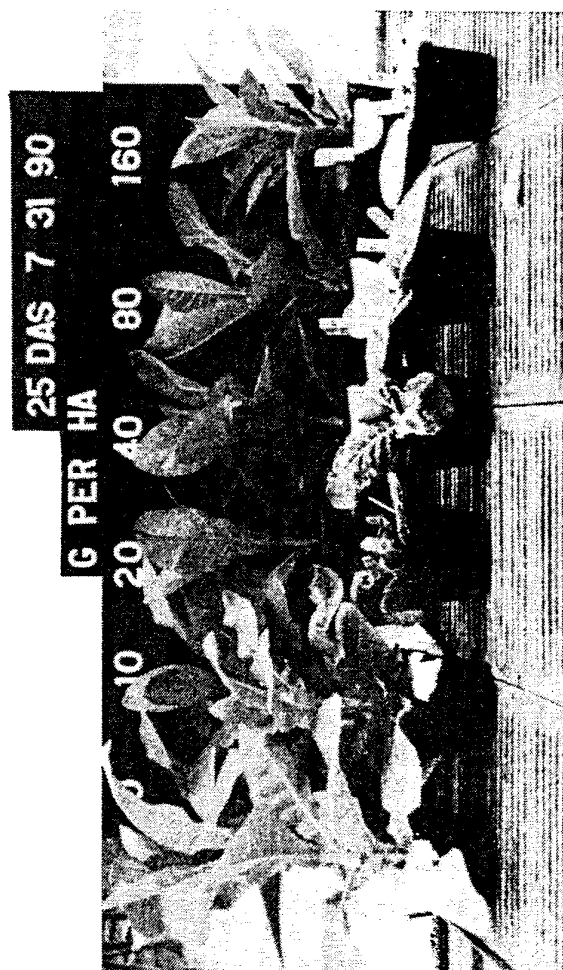


FIG.2a

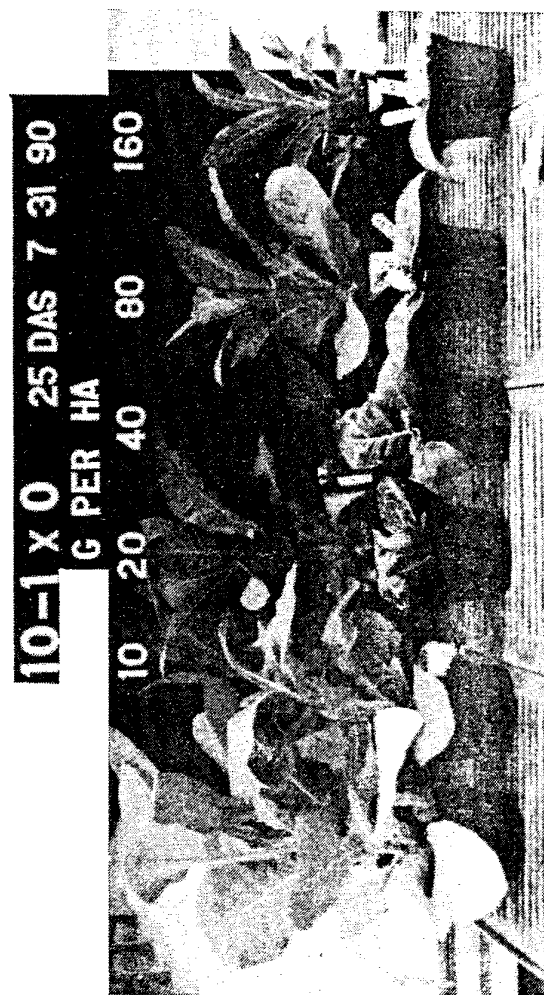


11

FIG.2b



FIG.2c



11

Efeito do Pursuit de plantas de tabaco derivadas de semente (autocruzado 10-1)
(C* = Selvagem; plantas R1 = progénie de R0 autocruzada)

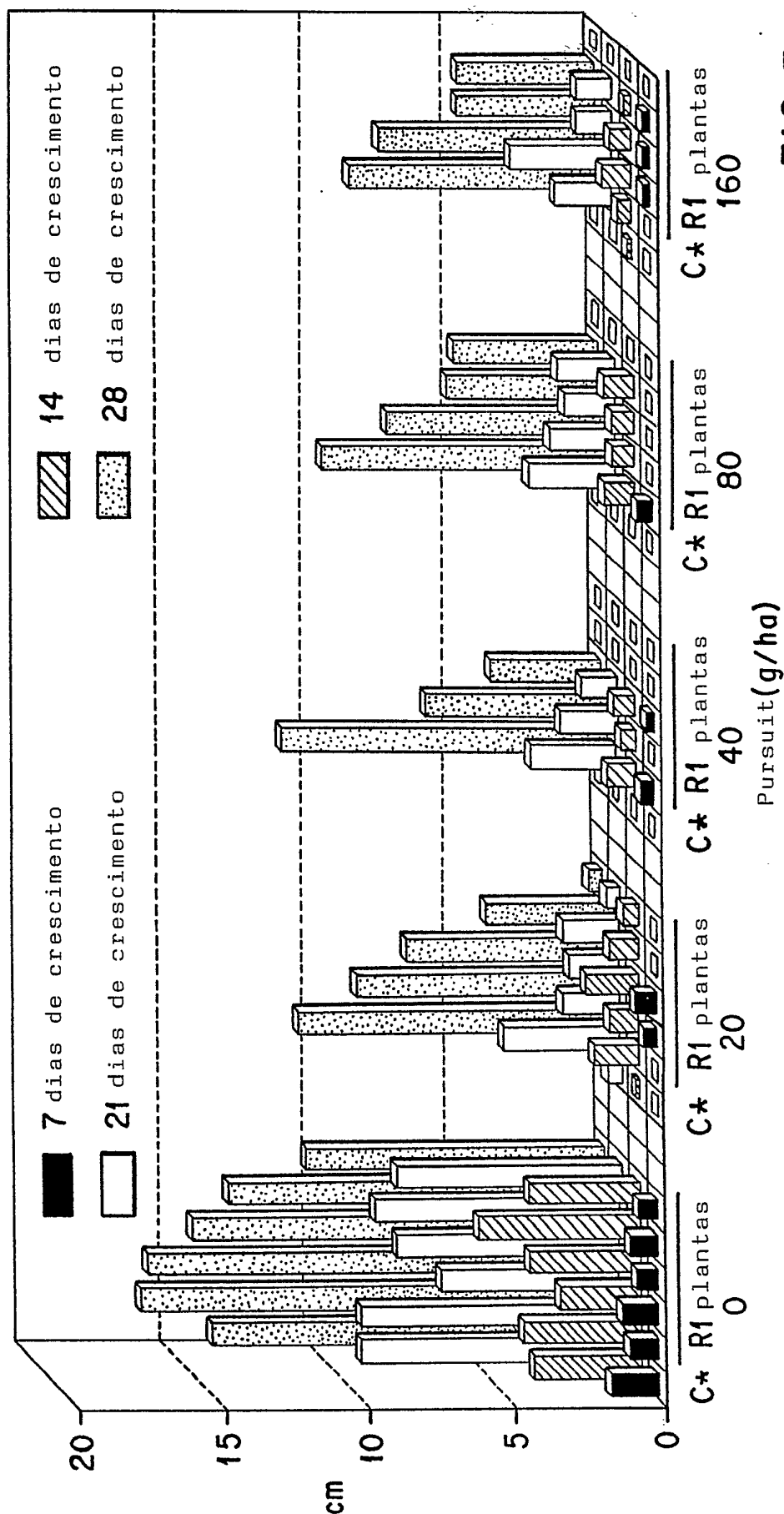


FIG. 3

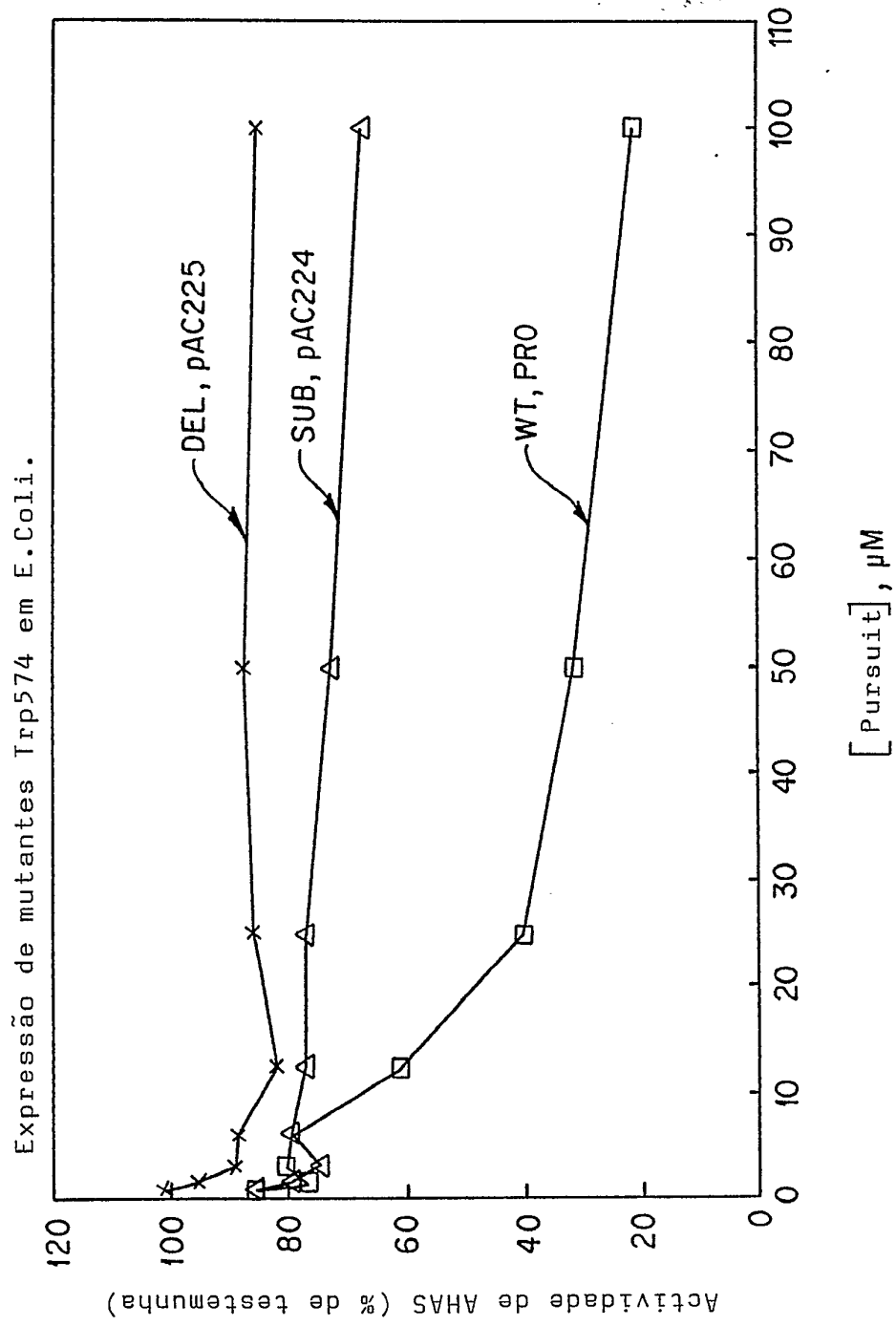


FIG. 4

Expressão de mutantes Trp574 em E.Coli.

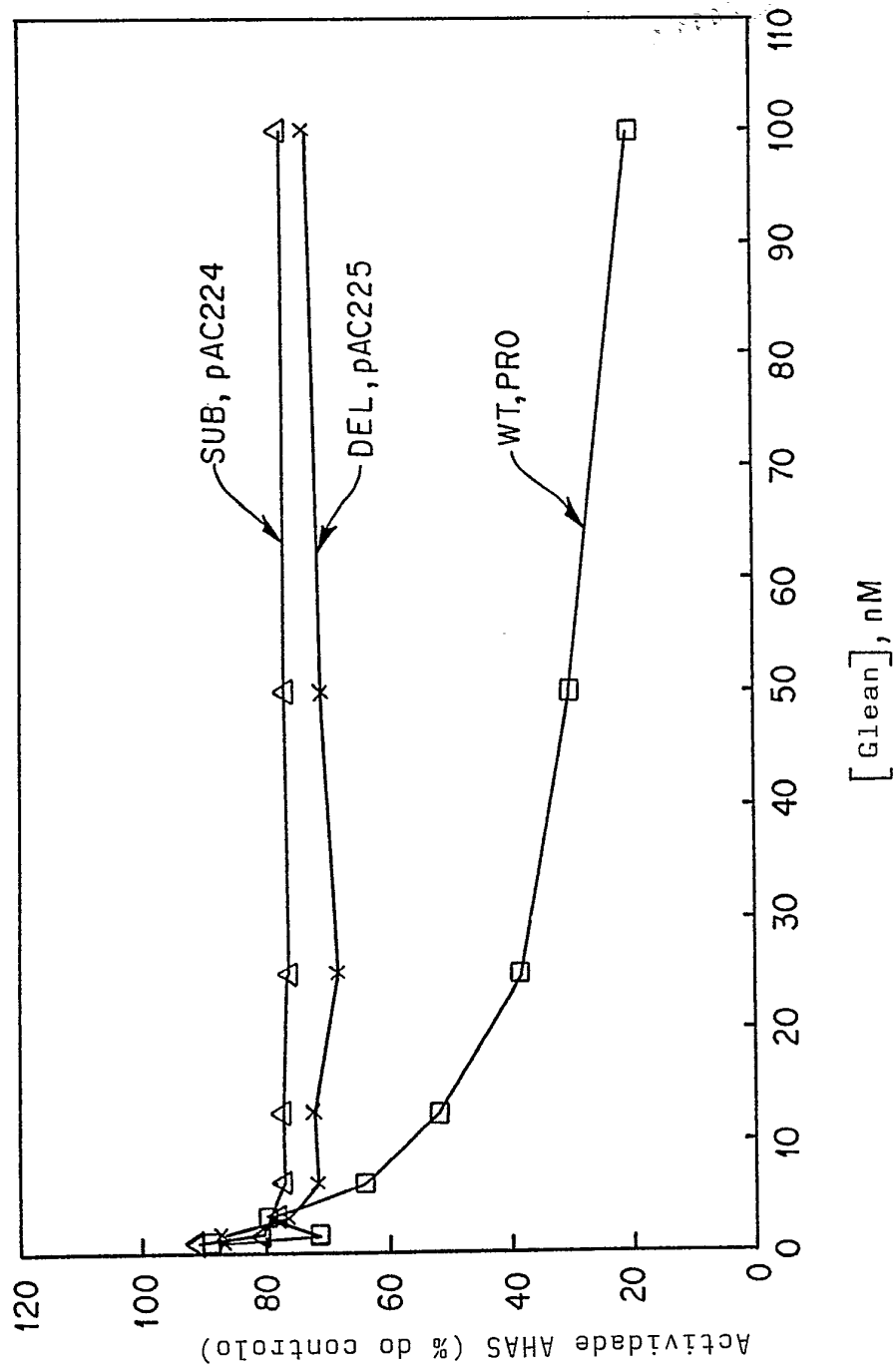


FIG. 5

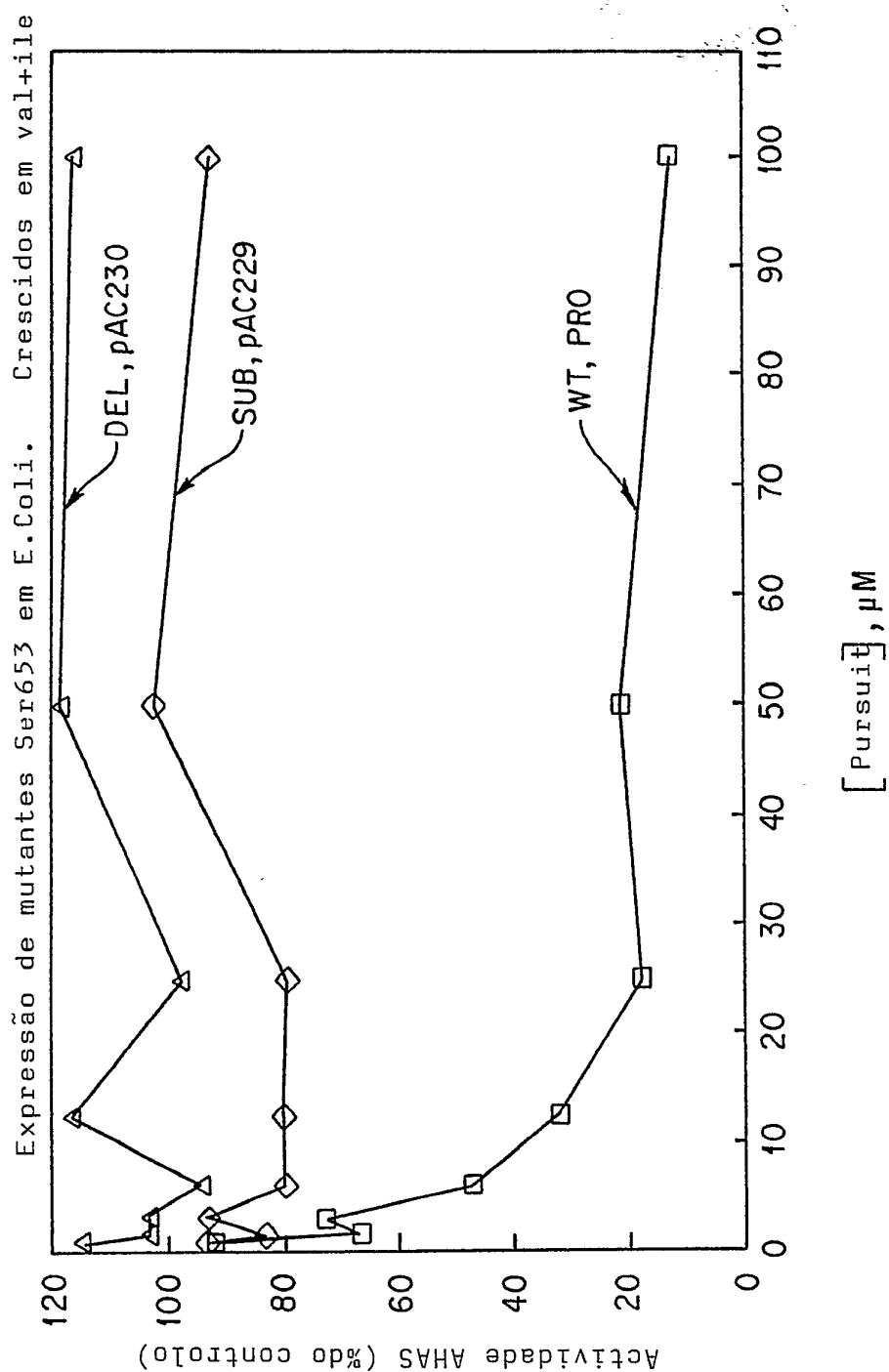


FIG. 6

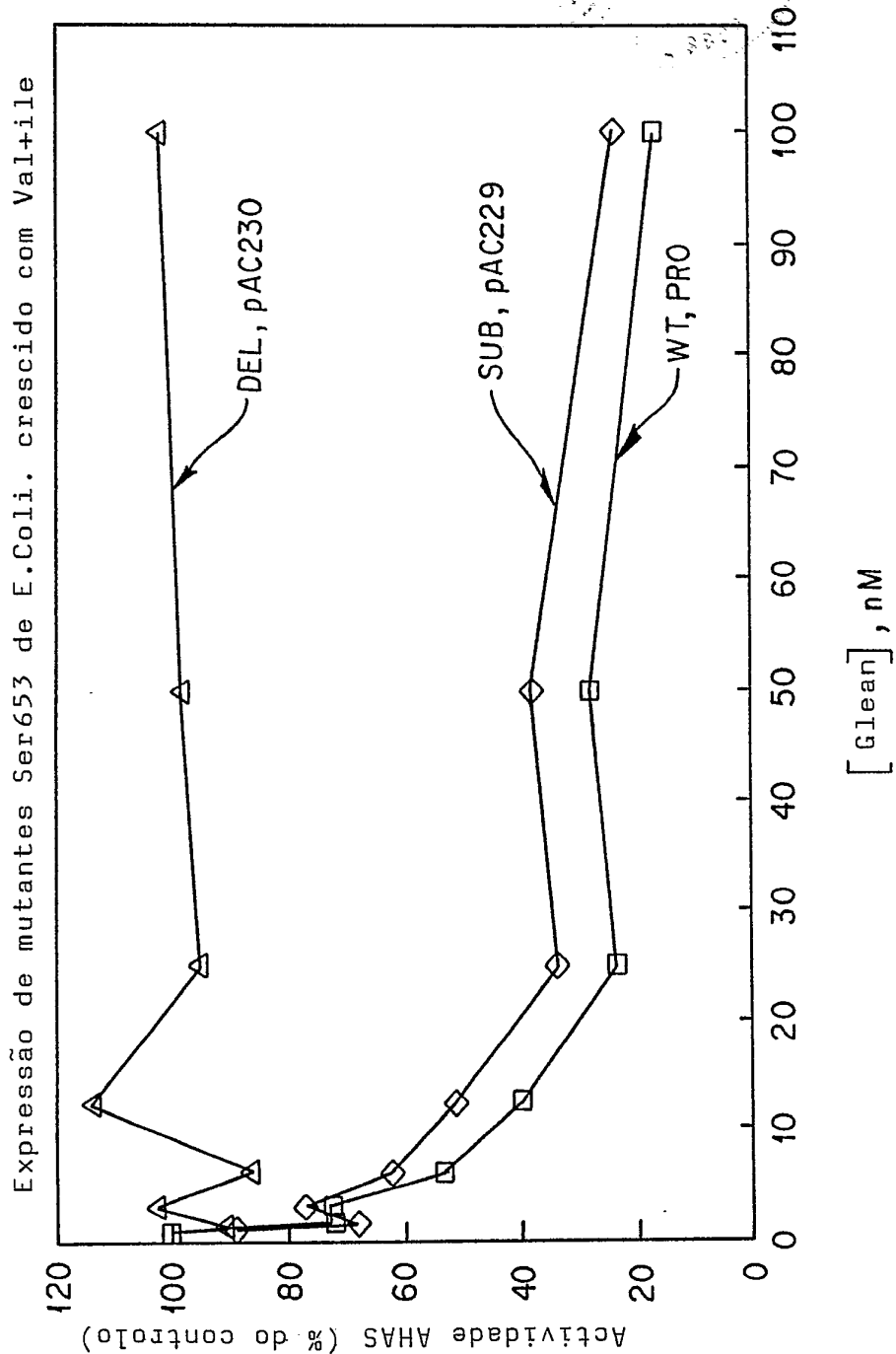


FIG. 7

11/11/11

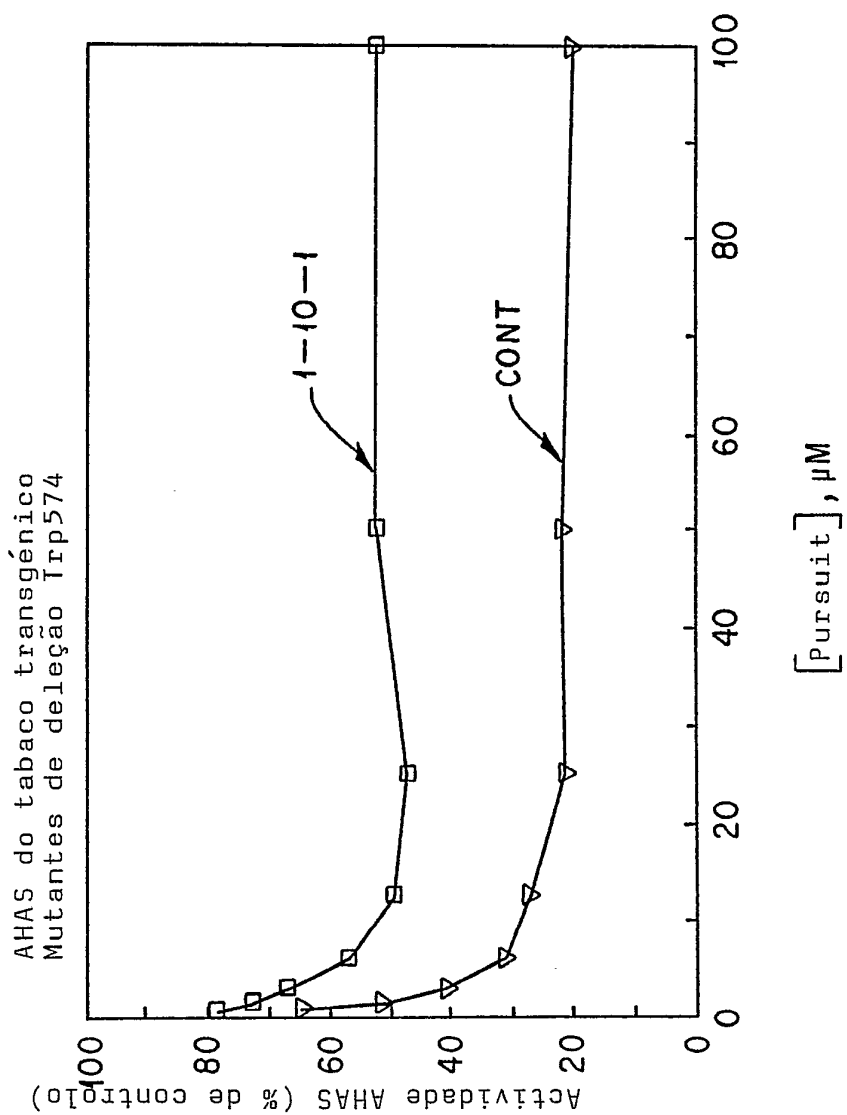


FIG. 8