



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0409239-2 B1



(22) Data do Depósito: 09/04/2004

(45) Data de Concessão: 14/01/2020

(54) Título: PLASMÍDEO DE DNA COMPREENDENDO GENE FITOENO SINTASE, BEM COMO MÉTODOS PARA MELHORAR A SELEÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS E PARA REDUZIR NÚMERO DE CÓPIAS DE TRANSGENE EM CÉLULA DE PLANTA

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; A01H 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 09/04/2003 US 60/461,459.

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

(72) Inventor(es): LARRY GILBERTSON; ELYSIA KRIEGER; WANGGEN ZHANG; XUDONG YE.

(86) Pedido PCT: PCT US2004011000 de 09/04/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/092390 de 28/10/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/10/2005

(57) Resumo: "CONSTRUCTOS DE DNA E MÉTODOS PARA MELHORAR A PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS COMERCIALMENTE VIÁVEIS". A presente invenção refere-se a um gene marcador selecionável negativo não-letal no DNA do esqueleto do vetor de um plasmídeo de DNA usado para transformar células de plantas. Estes transgenes são projetados para expressar um produto gênico não-letal em células de plantas que contém o DNA do esqueleto do vetor do plasmídeo de DNA. Os produtos gênicos do gene marcador selecionável negativo não-letal estão envolvidos nas vias de biossíntese de hormônio de planta, diversão de substrato de hormônio de planta, degradação de hormônio de planta, sinalização de hormônio de planta ou interferência metabólica. O uso destes plasmídeos de DNA para transformar células de plantas provê uma melhorada produção de plantas comercialmente viáveis.

"PLASMÍDEO DE DNA COMPREENDENDO GENE FITOENO SINTASE, BEM COMO MÉTODOS PARA MELHORAR A SELEÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS E PARA REDUZIR NÚMERO DE CÓPIAS DE TRANSGENE EM CÉLULA DE PLANTA".

5 Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório US no. 60/461 459, depositado em 9 de abril de 2003.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 Esta invenção refere-se ao campo de biologia molecular de plantas e engenharia genética de plantas. Os métodos de engenharia genética de plantas são usados para criar novos constructos de DNA que contêm elementos genéticos heterólogos que, quando expressados em plantas transgênicas, provêem fenótipos utilizáveis. Mais especificamente, a invenção compreende constructos de DNA e métodos para usar os constructos, de modo que mais plantas transgênicas que são regeneradas a partir de uma cultura de células de plantas são capazes de alcançar sucesso como candidatos a plantas comerciais.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

20 A transformação de células de plantas por um método mediado por *Agrobacterium* envolver expor as células de plantas e tecidos a uma suspensão de células de *Agrobacterium* que contém alguns plasmídeos de DNA. Estes plasmídeos de DNA foram especificamente construídos para conter transgenes que irão expressar em células de plantas (patente US 5 034 322). Com maior frequência, um ou mais dos transgenes é um transgene de marcador selecionável positivo que permite que as células de plantas cresçam na presença de um composto de seleção positivo, por exemplo, um antibiótico ou herbicida. Estas células podem ser ainda manipuladas para regenerar em plantas férteis completas.

25 Os métodos para introduzir transgenes em plantas por um método de transformação mediado por *Agrobacterium* utiliza um T-DNA (DNA de transferência) que incorpora os elementos genéticos de um transgene e transfere estes elementos genéticos no genoma de uma planta. O(s) transgene(s) é(são) construído(s) em um vetor plasmídeo de DNA e é(são) geralmente bordejado(s) por uma região de DNA de borda direita

(RB) e uma região de DNA de borda esquerda (LB) de plasmídeo Ti de *Agrobacterium*. Durante o processo de transferência mediado por *Agrobacterium*, o plasmídeo de DNA é cortado por endonuclease VirD2 nas regiões de borda direita e esquerda e a região de T-DNA é inserida no

5 genoma da planta. A integração do T-DNA no genoma da planta geralmente começa em RB e continua até a extremidade do T-DNA, em LB. No entanto, as endonucleases às vezes não cortam igualmente em ambas as bordas. Quando isto acontece, o T-DNA que é inserido no genoma da planta com

10 freqüência contém algum ou todo o DNA vetor do plasmídeo. Este fenômeno é referido como uma leitura completa da borda. Prefere-se geralmente que somente o(s) transgene(s) localizado(s) entre as regiões de borda direita e esquerda (T-DNA) seja(m) transferido(s) no genoma da planta sem qualquer um dentre o plasmídeo do DNA do vetor adjacente (esqueleto do vetor). O DNA do esqueleto do vetor contém vários elementos

15 genéticos de manutenção de plasmídeos, por exemplo, origem de replicações, genes de marcador selecionável bacteriano, e outros fragmentos de DNA não desejáveis em produtos de culturas comerciais devido a aspectos regulatórios.

Recursos consideráveis são dirigidos à triagem do genoma de

20 plantas de cultura transgênicas para a presença do DNA do esqueleto do vetor. Os métodos como reação de cadeia polimerase (PCR) e análise de Southern blot são com maior freqüência empregados para identificar o DNA do esqueleto do vetor estranho. Estes métodos são consumidores de tempo e onerosos para um trabalho de triagem em larga escala. O DNA do

25 esqueleto do vetor pode ser incorporado por leitura através da região de borda esquerda ou pode integrar no genoma da planta independentemente do T-DNA (Kononov, et al., *Plant J.* 11, 945 - 957, 1997). As plantas transgênicas que são encontradas como contendo o DNA do esqueleto do vetor geralmente não são viáveis para comercialização. Esforços

30 substanciais foram gastos na regeneração de plantas a partir de cultura de células de plantas que não tem potencial comercial. Seria utilizável ter um constructo de DNA e um método que iriam reduzir, muito, a ocorrência de

13

DNA do esqueleto do vetor no genoma de plantas transgênicas. Um número menor de plantas transgênicas seria necessário produzir se um número maior fosse isento de DNA do esqueleto do vetor. Assim, menos testes seriam necessários para confirmar que o DNA do esqueleto se encontra ausente.

5 Hanson, *et al.* (patente U.S. número 6.521.458) descrevem um constructo de DNA que contém um gene letal no esqueleto do vetor que, quando expressado, mata a célula da planta. No entanto, o controle da estrutura de produtos gênicos letais em bactérias e células de plantas pode ser problemático. A expressão de genes letais deve ser controlada por

10 vários elementos genéticos para evitar a expressão em bactérias e em tecidos e células de plantas não-alvo. O uso de genes marcadores selecionáveis negativos não-letais para células de plantas no esqueleto deve ser uma melhora substancial com relação ao uso de genes letais. Os

15 genes marcadores selecionáveis negativos não-letais podem prover um meio visual para distinguir as células de plantas e tecidos que estão expressando os produtos gênicos marcadores selecionáveis negativos não-letais, a seleção das células de plantas e plantas é mais controlável, e as células de plantas contendo os genes marcadores selecionáveis negativos

20 não-letais são potencialmente recuperáveis. O gene usado para este fim pode ser qualquer gene afetando a divisão de células de plantas, alongamento dos brotos ou produção de brotos pleiotrópicos ou fenótipos de folhas.

Os genes marcadores classificáveis, por exemplo, beta-glucuronidase (GUS) (Kononov, *et al.*, *Plant J.* 11, 945 - 957, 1997), podem

25 fornecer um meio para detectar a presença de DNA do esqueleto, mas não provêm um meio para selecionar contra as células que contêm os mesmos e o teste é destruidor do tecido. Os genes marcadores selecionáveis negativos que são letais condicionais também podem ser usados no DNA

30 do esqueleto. Os exemplos representativos de outros produtos gênicos letais condicionais incluem : guanina fosforibosil transferase de *E. coli* que converte tioxantina em monofosfato de tioxantina tóxico (Besnard *et al.*, *Mol.*

M
N

Cell. Biol. 7: 4139 - 4141, 1987); fosfatase alcalina, que irá converter compostos fosforilados inativos como fosfato de mitomicina e fosfato de doxorubicina em compostos desfosforilados tóxicos; citosina deaminase fúngica (por exemplo, *Fusarium oxysporum*) ou bacteriana (codA) que irá

5 converter 5-fluorocitosina no composto tóxico 5- fluorouracil (Mullen, PNAS 89: 33, 1992); carboxipeptidase G2 que irá clivar o ácido glutâmico a partir de ácido para-N-bis (2-cloroetil) aminobenzoil glutâmico, assim criando uma mostarda de ácido benzóico tóxico; e Penicilina-V amidase, que irá converter derivados de fenoxiacetabídeo de doxorubicina e melfalan em

10 compostos tóxicos (ver geralmente, Vrudhula et al., J. of Med. Chem. 36 (7): 919 - 923; 1993; Kern et al., Canc. Immun. Immunother. 31 (4): 202 - 206, 1990); e fosfonato monoéster hidrolase, *pehA* (patente U.S. número 5.254.801). No entanto, os substratos exógenos devem ser adicionados a fim de prover o produto tóxico que é letal para a célula contendo o DNA do

15 esqueleto . A presente invenção não requer a adição de substratos adicionais para o meio de cultura ou tratamento exógeno das células de cultura de plantas com um substrato, como necessário para o produto gênico letal condicional.

Os genes de transdução de sinal de hormônio de plantas e

20 genes de via biossintética de hormônio podem ser usados como genes marcadores selecionáveis para a transformação de plantas e em um método para produzir plantas transgênicas isentas de marcador (patente U.S. número 6.326.192). No entanto, estes genes devem ser removidos se as plantas devem ser ainda desenvolvidas como plantas comercialmente

25 viáveis, como descrito. Os genes e composições ilustradas aqui podem ser usados na presente invenção como genes marcadores selecionáveis negativos não-letais do DNA do esqueleto do vetor.

Os produtos gênicos que metabolizam os substratos de células de plantas endógenas funcionam como gene de interferência metabólica da

30 presente invenção. Por exemplo, um gene *sacB*, codificando levansucrase e responsável pela síntese de polifrutano (levan) neutro usando sacarose como o substrato, foi identificado em muitas bactérias como *Bacillus* spp.,

Erwinia spp. etc. As plantas transgênicas expressando o gene *sacB* visaram um aumento na resistência à seca ou estiagem ou resistência à deterioração foram previamente registrados em tabaco, batata, beterraba de açúcar, milho e erva-castelhana (Ebskamp et al. Bio/Technol. 12, 272 - 275, 1994; van der Meer et al. Plant Cell, 6, 561 - 570, 1994; Caimi et al. Plant Physiol. 110, 355 - 363, 1996; Rober et al. Planta, 199, 528 - 536, 1996; Ye et al. Plant Cell Rep., 20: 205 - 212, 2001). No entanto, quando o gene *sacB* marcado no vacúolo acionado pelo promotor de CaMV 35S foi transformado repetidas vezes em tabaco e erva-castelhana, somente as plantas atrofiadas foram recuperadas (Ye et al. 2001). Em milho, as sementes contidas em noz ou caroço expressando *sacB* prejudicaram o enchimento dos grãos e resultaram em sementes enrugadas com uma frequência de germinação muito baixa (Caimi et al. 1996). Em batata, a expressão do gene *sacB* em tubérculos leva a tubérculos menores (Rober et al. 1996). Estes resultados revelaram que a expressão do gene *sacB* inibe severamente o desenvolvimento do tecido e células de plantas.

Outros genes codificando enzimas de interferência metabólica, como levedura invertase, levedura trehalose-6-fosfato sintase também podem ser usados do mesmo modo. Foi registrado que a expressão de levedura invertase (Suc2, Carlson et al., Nucleic Acids Res. 11 (6), 1943 - 1954, 1983) em tabaco e *Arabidopsis* inibem fortemente o alongamento do broto e o desenvolvimento da raiz (Sonnewald et al. Plant J. 1: 95 - 106, 1991), e expressão constitutiva de levedura trehalose-6-fosfato sintase (TPS1, Bell et al. Eur. J. Biochem. 209 (3), 951 - 959 (1992) em tabaco demonstrou o crescimento definhado e folhas em forma de lanceta (Romero et al. Planta 201: 293 - 297, 1997). Os genes de interferência metabólica, por exemplo, um polinucleotídeo codificando uma levansucrase, uma invertase ou uma trehalose-6-fosfato sintase são utilizáveis como transgenes marcadores selecionáveis negativos não-letais na presente invenção.

A presente invenção incorporou um transgene marcador selecionável negativo não-letal no DNA do esqueleto do vetor de um

Mb

plasmídeo de DNA usado para transformar células de plantas. Estes transgenes são projetados para expressar um produto gênico não-letal em células de plantas que contêm o DNA do esqueleto do vetor do plasmídeo de DNA. Os produtos gênicos do transgene marcador selecionável negativo não-letal estão envolvidos nas vias biossintéticas de hormônio de plantas, diversão de substrato de hormônio de plantas, degradação de hormônio de plantas ou interferência metabólica. O uso destes plasmídeo de DNAs para transformar células de plantas fornece uma produção melhorada de plantas comercialmente viáveis.

10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção compreende um plasmídeo de DNA compreendendo uma primeira região de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium* ligada a pelo menos um transgene, o transgene pode ser um gene marcador selecionável e adicional um gene agrônômico de interesse ligado a uma segunda região de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium* ligada a um DNA do esqueleto do vetor, em que está contido um gene marcador selecionável negativo não-letal. O gene marcador selecionável negativo não-letal compreende um gene de via biossintética de hormônio de plantas ou um gene de interferência metabólica. A superexpressão de gene de via biossintética de hormônio de plantas provê uma expressão melhorada de um hormônio de planta, ou serve para converter um substrato de hormônio de planta em um análogo de hormônio não-funcional, ou para a diversão do substrato de hormônio de planta para outra via biossintética. O gene marcador selecionável negativo não-letal ainda compreende um gene degradativo do hormônio de planta que reduz a quantidade de hormônio de planta endógeno. O gene marcador selecionável negativo não-letal pode ainda compreender um gene biossintético de hormônio de planta ou uma porção do mesmo disposta em uma orientação anti-sentido que reduz a quantidade de um hormônio endógeno de planta por supressão do gene pós-transcricional. O gene marcador selecionável negativo não-letal pode ainda compreender um gene de interferência metabólica que, quando superexpressado em uma célula de planta, provê um fenótipo anômalo. O

fenótipo anômalo é preferivelmente um fenótipo de crescimento reduzido ou uma má formação de brotos ou folhas.

O plasmídeo de DNA ainda compreende cassetes de expressão de plantas que compreende promotores que funcionam em células de plantas. Estes cassetes de expressão de plantas provêm genes marcadores selecionáveis positivos de plantas, genes de interesse agrônômico, e os genes marcadores selecionáveis negativos não-letais.

O gene marcador selecionável negativo não-letal que compreende um gene de via biossintética de hormônio de planta contido no plasmídeo de DNA é selecionado dentre o grupo consistindo em genes de via de ácido gibberélico (GA), genes de via citocinina, gene de via auxina, genes de via etileno e genes de via de ácido abscísico.

O plasmídeo de DNA da presente invenção compreende um gene marcador selecionável negativo não-letal que provoca a diversão dos substratos de via GA para compostos ativos não-GA. Por exemplo, um transgene deste tipo codifica uma enzima que compreende a fitoeno sintase, GA 20-oxidase ou GA 2 β , 3 β -hidroxilase. Um plasmídeo de DNA pode conter uma enzima degradando GA, por exemplo, uma GA 2-oxidase.

O plasmídeo de DNA da presente invenção compreende um gene marcador selecionável negativo não-letal que codifica uma enzima na via biossintética de citocinina, por exemplo, uma isopentenil transferase (IPT).

O plasmídeo de DNA da presente invenção compreende um gene marcador selecionável negativo não-letal que é uma enzima na via biossintética de auxina, por exemplo, um gene IAA sintase de planta ou genes de tumor de *Agrobacterium*, *iaaM*, *iaaH*, *rolABC* ou outros genes de raiz pilosa ou tumor isolados de várias espécies de *Agrobacterium*.

O plasmídeo de DNA da presente invenção compreende um gene marcador selecionável negativo não-letal que é uma enzima na via biossintética de etileno. Por exemplo, um gene codificando uma ACC sintase. Um plasmídeo de DNA também pode conter um gene que codifica para uma enzima degradando etileno, por exemplo, ACC deaminase. Um

plasmídeo de DNA da presente invenção pode também conter um gene que codifica um receptor de etileno. Um plasmídeo de DNA da presente invenção também pode conter um transgene que codifica uma proteína de sinalização de hormônio de planta.

5 O plasmídeo de DNA da presente invenção compreende um gene marcador selecionável negativo não-letal que é um gene de interferência metabólica. Por exemplo, os genes de interferência metabólica incluem, mas não são limitados a gene *sacB* codificando uma levansucrase, um gene *Suc2* que codifica uma levedura invertase, ou um gene *TPS1*
10 codificando uma levedura trehalose-6-fosfato sintase. Os genes de interferência metabólica adicionalmente incluem os que são construídos para funcionar em um mecanismo de supressão de genes pós-transcricional.

O plasmídeo de DNA da presente invenção é transformado em
15 uma célula de *Agrobacterium* para uso em um método para a transferência para os transgenes de células de plantas contidos no plasmídeo. A célula de *Agrobacterium* compreende um plasmídeo de DNA compreendendo uma primeira região de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium* ligada a pelo menos um transgene de interesse agrônômico ligado a uma segunda região
20 de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium* ligada a um gene marcador selecionável negativo não-letal ligado a um DNA do esqueleto do vetor.

A invenção provê um método para melhorar a seleção de plantas transgênicas comercialmente viáveis compreendendo as etapas de :
a) transformar uma pluralidade de células de plantas com o plasmídeo de
25 DNA compreendendo um gene marcador selecionável positivo no T-DNA e um gene marcador selecionável negativo não-letal na estrutura do plasmídeo; e b) selecionar as referidas células de plantas em um composto de seleção positivo; e c) regenerar as referidas células de plantas selecionadas em plantas intactas; em que as plantas são reduzidas na
30 ocorrência de DNA do esqueleto de plasmídeo e tem um número de cópias menor para o transgene de interesse agrônômico. As plantas produzidas pelo método são um aspecto da invenção.

19

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática de plasmídeos de DNAs da presente invenção

Figura 2. Mapa de plasmídeo de pMON80101

5

Figura 3. Mapa de plasmídeo de pMON77406

Figura 4. Mapa de plasmídeo de pLAGILBO1.0033

Figura 5. Mapa de plasmídeo de pLAGILBO1.0037

Figura 6. Mapa de plasmídeo de pMON69869

Figura 7. Mapa de plasmídeo de pMON75157

10

Figura 8. Mapa de plasmídeo de pMON75182

Figura 9. Mapa de plasmídeo de pLAGILBO1.0035

Figura 10. Mapa de plasmídeo de pLAGILBO1.0038

Figura 11. Mapa de plasmídeo de pMON75183

Figura 12. Mapa de plasmídeo de pMON75181

15

Figura 13. Mapa de plasmídeo de pMON42066

Figura 14. Efeito de gene marcador selecionável não-letal na frequência do esqueleto de plantas de milho transformadas com pMON75181 (crtB) e pMON75182 (ipt).

Figura 15. Efeito de gene marcador selecionável não-letal (crtB) no número de cópia de insertos de plantas de milho transformadas com pMON75181 (crtB) e pMON75182 (ipt).

20

Figura 16. Mapa de plasmídeo de pMON73564

Figura 17. Mapa de plasmídeo de pMON73565

Figura 18. Efeito de gene marcador selecionável não-letal na frequência do esqueleto de plantas de milho transformadas com pMON73565 (crtB+).

25

Figura 19. Efeito de gene marcador selecionável não-letal no número de cópia de insertos de plantas de milho transformadas com pMON73565 (crtB+).

30

Figura 20. Mapa de plasmídeo de pMON67935

Figura 21. Mapa de plasmídeo de pMON67936

Figura 22. Efeito de gene marcador selecionável não-letal na

freqüência do esqueleto de plantas de milho transformadas com pMON67936 (crtB+).

Figura 23. Efeito de gene marcador selecionável não-letal no número de cópia de insertos de plantas de milho transformadas com pMON67936 (crtB+).

Figura 24. Mapa de plasmídeo de pMON83912

Figura 25. Mapa de plasmídeo de pMON83908

Figura 26. Mapa de plasmídeo de pMON83907

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

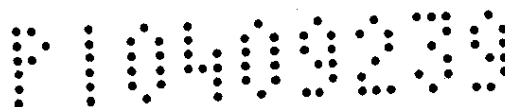
A presente invenção é baseada, em parte, em um plasmídeo de DNA que contém um cassete de gene marcador selecionável negativo não-letal localizado em uma região do plasmídeo que está fora de um T-DNA e associada com o DNA de manutenção de plasmídeo (DNA do esqueleto do vetor). O gene marcador selecionável negativo não-letal contém um produto gênico que quando expressado em uma célula de planta transgênica é não-letal, no entanto, interfere com a regeneração normal da célula de planta transgênica em uma planta transgênica intacta que inclui broto, folhas e raízes. A invenção provê um método para uso do plasmídeo de DNA para melhorar a seleção de células de plantas que são para uso comercial. As células de plantas que são regeneradas em plantas transgênicas férteis intactas tem melhorada viabilidade comercial devido em parte à ausência de DNA do esqueleto do vetor e em parte ao número de cópia reduzido do T-DNA no genoma da planta.

Moléculas de ácido polinucleico da presente invenção

As moléculas de DNA que codificam os produtos gênicos de marcador selecionável negativo não-letal são identificadas na presente invenção de modo a compreender uma molécula de ácido polinucleico que, quando expressada em uma célula de planta é não-letal para a célula de planta, no entanto, interfere com a capacidade da célula de planta de regenerar em uma planta intacta em uma taxa normal ou produzir um fenótipo anômalo comparado com as células de plantas ou partes de plantas regeneradas que não contêm a molécula de ácido polinucleico.

A molécula de ácido polinucleico como usada aqui significa uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou molécula de ácido ribonucleico (RNA). Ambas as moléculas de DNA e RNA são construídas a partir de nucleotídeos ligados extremidade a extremidade, em que cada um dos nucleotídeos contém um grupo fosfato, uma porção de açúcar, e ou uma base purina ou pirimidina. As moléculas de ácido polinucleico podem ser polímeros de filamento único ou duplo de nucleotídeos ligados da extremidade 5' para a 3'. As moléculas de ácido polinucleico também podem opcionalmente conter bases de nucleotídeos sintéticas, não-naturais ou alteradas que permitem a leitura correta através de uma polimerase e não alteram a expressão de um polipeptídeo codificado por esta molécula de ácido polinucleico.

A molécula de polinucleotídeo da presente invenção é definida por uma sequência de nucleotídeo, que, como usado aqui, significa a disposição linear de nucleotídeos para formar um polinucleotídeo dos filamentos sentido e complementar de uma molécula de ácido polinucleico ou como filamentos únicos individuais ou em duplex. Como usado aqui, ambos os termos "uma sequência de codificação" e "uma molécula de polinucleotídeo estrutural" significam uma molécula de polinucleotídeo que é traduzida em um polipeptídeo, geralmente através de mRNA, quando colocada sob o controle de moléculas regulatórias apropriadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um códon de partida de tradução no término 5' e um códon de parada de tradução no término 3'. Uma sequência de codificação pode incluir, mas não é limitada a, DNA genômico, cDNA, e sequências de polinucleotídeos recombinantes. Os homólogos, ortólogos ou parálogos de polinucleotídeos codificando os produtos gênicos marcadores selecionáveis negativos não-letais usados na presente invenção podem ser identificados em bases de dados de DNA e isolados do organismo fonte. Alternativamente, uma molécula de DNA artificial codificando os produtos gênicos marcadores selecionáveis negativos não-letais podem ser projetados e criados por síntese química usando procedimentos bem conhecidos dos versados. Os iniciadores de



DNA e sondas são com freqüência moléculas de DNA sintéticas. Além disso, as seqüências de codificação de comprimento completo ou fragmentos dos mesmos podem ser feitos usando moléculas de iniciador de DNA sintético usando métodos bem conhecidos dos versados na técnica.

5 As moléculas de ácido polinucleico da presente invenção podem ser combinadas com outras seqüências não-nativas, ou "heterólogas" em vários modos. Por seqüências "heterólogas" significa-se qualquer seqüência que não é naturalmente encontrada unida à seqüência de nucleotídeo provendo um produto gênico da presente invenção incluindo, por exemplo, 10 combinações de seqüências de nucleotídeos da mesma planta que não são naturalmente encontradas unidas juntas, ou as duas seqüências se originam de duas diferentes espécies. O termo "ligado de modo operativo" ou "ligado" como usado aqui faz referência à disposição física e funcional de moléculas de polinucleotídeos regulatórios e estruturais que causa a expressão 15 regulada de uma molécula de polinucleotídeo estrutural ligada de modo operativo.

 A expressão de um constructo de DNA ou transgene significa o acúmulo de transcrição e estável de RNA sentido ou anti-sentido ou proteína derivada da molécula de polinucleotídeo da presente invenção ou 20 tradução da mesma. O RNA "sentido" significa transcrito de RNA que inclui o mRNA e também pode ser traduzido em polipeptídeo ou proteína pela célula. O "RNA anti-sentido" significa um transcrito de RNA que é complementar a todo ou parte de um transcrito primário de marcação ou mRNA e que, quando expressado em uma célula transgênica, interfere com 25 a expressão de um gene de marcação (patente US 5 107 065). A complementaridade de um RNA anti-sentido pode ser com qualquer parte do transcrito de gene específico, isto é, na seqüência de não-codificação 5', seqüência não-traduzida 3', íntrons, ou a seqüência de codificação. "Transcrito de RNA" significa o produto resultando da transcrição catalisada 30 por RNA polimerase de uma seqüência de DNA. Quando o transcrito de RNA é uma cópia complementar perfeita da seqüência de DNA, ela é referida como o transcrito primário ou pode ser uma seqüência de RNA

derivada de processamento pós-transcricional do transcrito primário e é referida como o RNA maduro. Uma molécula de polinucleotídeo da presente invenção pode compreender uma seqüência anti-sentido complementar a um polinucleotídeo de marcação de célula hospedeira. Uma molécula de polinucleotídeo da presente invenção também pode compreender um produto de RNA de filamento duplo que, quando expressado na célula hospedeira, provê supressão de gene pós-transcricional de um gene hospedeiro de marcação.

A supressão de genes pós-transcricional por RNA orientado anti-sentido para regular a expressão de gene em células de plantas é descrita na patente US 5 107 065 e patente US 5 759 829. A supressão de genes pós-transcricional por DNA orientado sentido para regular a expressão de genes em plantas é descrita na patente U.S. número 5.283.184 e patente U.S. número 5.231.020. A supressão de genes pós-transcricional por RNA de filamento duplo para suprimir genes em plantas por RNAi é descrita na publicação internacional. WO 99/53050 usando constructos de DNA recombinante compreendendo elementos orientados sentido e orientados anti-sentido de um gene marcado em unidades de transcrição separadas ou em uma unidade de transcrição única. Ver também publicação internacional número WO 99/49029, publicação do pedido da patente U.S. número 2003/0175965 A1 (Lowe *et al.*), pedido da patente U.S. número 10/465.800, e patente U.S. número 6.506.559. Outro constructo de DNA para supressão de gene RNAi compreendendo um elemento de gene orientado unicamente bordejado por promotores orientados de modo oposto é descrita na publicação do pedido da patente U.S. número 2003/0061626 A1 e patente U.S. número 6.326.193. Ver também número de série do pedido U.S. 10/393.347, que descreve constructos e métodos para a expressão simultânea de um ou mais genes recombinantes enquanto simultaneamente suprimindo um ou mais genes nativos em uma planta transgênica. Ver também patente U.S. número 6.448.473, que descreve vetores de expressão de multigenes para uso em plantas. Todas as patentes, pedidos e publicações internacionais acima

M
D

mencionados descrevendo materiais e métodos para a supressão de gene pós-transcricional em plantas são incorporadas aqui por referência.

Um método preferido de supressão de gene pós-transcricional em plantas emprega RNA transcrito, ou orientado sentido ou orientado anti-sentido, que é estabilizado, por exemplo, com uma estrutura terminal em gancho. Um constructo de DNA preferido para efetuar a supressão de gene pós-transcricional é transcrito para um segmento de RNA orientado anti-sentido tendo homologia para um gene marcado para supressão, onde o segmento de RNA anti-sentido é seguido pela extremidade 3' por um segmento mais curto, complementar, contíguo, de RNA na orientação sentido. O uso de oligonucleotídeos de RNA anti-sentido auto-estabilizados em plantas é descrito na publicação internacional número 94/01550. Ver também publicação internacional número 98/05770 onde o RNA anti-sentido é estabilizado por repetições da formação de gancho de poli (CG) nucleotídeos. Ver também publicação de pedido da patente U.S. número 2002/0048814 A1, onde RNA sentido ou anti-sentido é estabilizado por uma cauda poli (T) – poli (A). Ver também publicação de pedido de patente U.S. número 2003/0018993 A1 onde o RNA sentido ou anti-sentido é estabilizado por uma repetição invertida de uma subsequência de um gene NOS. Ver também publicação de pedido de patente U.S. número 2003/0036197 A1 (Glassman *et al.*) onde RNA tendo homologia para uma marcação é estabilizado por duas regiões de RNA complementares.

O transgene marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta da presente invenção compreende polinucleotídeos que codificam para polipeptídeos e enzimas relacionadas com hormônios de plantas. Os hormônios de plantas, que incluem gibberelinas, citocininas, auxinas, etileno e ácido abscísico podem ser manipulados para efetuar a regeneração de células de plantas em plantas intactas.

A superexpressão de uma classe de enzimas que usam substratos de via biossintética de ácido gibberélico (GA), mas que não resultam na produção de GA bioativo são utilizáveis para reduzir a quantidade de substrato disponível para biossíntese de GA em uma célula

2/11

de planta. A via GA e descrição de enzimas e substratos como ilustrado na publicação de patente U.S. número 2002005309 e WO 0009722, e incluindo GA 20-oxidase (patente U.S. número 6.455.675) e GA 2 β , 3 β -hidroxilase, e fitoeno sintase. A fitoeno sintase é uma enzima envolvida na produção de

5 vitamina A (patente U.S. número 5.656.472, US 20020051998, US 20020092039, patente U.S. número 6.429.356, incorporada aqui por referência). O DNA codificando fitoeno sintase foi isolado de fontes bacterianas e plantas (patente U.S. número 5.429.939, incorporada aqui por referência). O gene fitoeno sintase de *Erwinia herbicola* (*crtB*, patente U.S.

10 número 6.429.356) é particularmente utilizável para a produção de pigmentos de carotenóides e na presente invenção para reduzir a regeneração da célula de planta. Fray *et al.* (The Plant Journal 8: 693 - 701, 1995) mostraram que a expressão constitutiva de um gene fitoeno sintase de fruta em tomates transgênicos causa ananismo por redirecionamento de

15 metabólitos da via de gibberelina. A enzima fitoeno sintase como usada na presente invenção funciona para divergir o substrato pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) da via biossintética de ácido gibberélico para a via biossintética de carotenóide em células de plantas contendo o DNA do esqueleto do vetor. A diversão resultante resulta em uma quantidade

20 reduzida de substrato disponível para a produção de GA. A célula de planta reduzida em GA é retardada na formação de brotos durante a regeneração de plantas da cultura de tecido de célula de planta. Adicionalmente, o tecido de calo de planta em cultura é uma cor laranja devido à super-produção de pigmentos carotenóides. A presente invenção provê um constructo de DNA

25 contendo um gene fitoeno sintase no esqueleto do vetor que, quando superexpressado em uma célula de planta, reduz a taxa em que a célula de planta regenera em uma planta intacta, assim provendo uma vantagem selecionável para as células de plantas transgênicas não contendo o esqueleto do vetor. Outras enzimas de via biossintética de GA que incluem

30 GGPP sintases (patente U.S. número 6.410.356) também são utilizáveis na presente invenção. As seqüências de gene GA 2-oxidase, por exemplo isoladas de feijão, *Arabidopsis*, feijão de soja, milho, e algodão (patente U.S.

número 6.670.527 e publicação de patente U.S. número US 20020053095, incorporadas aqui por referência) podem ser usadas para reduzir os níveis de GA e retardar o alongamento do broto em cultura de célula de planta. Um produto gênico GA 2-oxidase funciona por redução de níveis bioativos de gibberelina. A hidroxilação de GAs bioativos, como GA1 e GA4, por 2-oxidase, torna as mesmas inativas, enquanto a hidroxilação de precursores biossintéticos, como GA9 e GA20, cria substratos não preferíveis para as enzimas biossintéticas GA. A superexpressão da proteína 2-oxidase pode ser usada, assim, para inativar diretamente os níveis de GA ou indiretamente regular de modo descendente os níveis de GA bioativo endógenos ao afetar os níveis de substrato e, assim, retardar a regeneração de brotos. A presente invenção provê constructos de DNA que contêm enzimas relacionadas com GA, aqui descritas, em que o cassete de expressão de plantas contendo o ácido polinucleico codificando estas enzimas relacionadas com GA ocorrem no DNA do esqueleto do vetor.

A superexpressão transgênica de enzimas na via biossintética de citocinina foi mostrada como afetando os níveis de citocinina em células de plantas e plantas transgênicas. Por exemplo, isopenteniltransferase (IPT) é uma enzima usada em síntese de citocinina, o gene (*ipt*) tendo sido isolado de plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Barry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 4776 - 4780, 1984). Isopenteniltransferase usa 5'-AMP e difosfato de isopentenila para catalisar a formação de isopenteniladenosina-5'-monofosfato, o primeiro intermediário em biossíntese de citocinina. A superexpressão IPT leva a níveis de citocinina elevados em plantas transgênicas (Medford *et al.*, Plant Cell 1: 403 - 413, 1989). A expressão de IPT em uma célula de planta pode induzir a regeneração de brotos fisiologicamente anormais a partir de protoplastos transformados ou discos de folhas. Este fenótipo pode ser usado como um marcador (Ebinuma *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 2117 - 2121, 1997). A expressão de gene CKI1 (independente de *citocinina* 1) provê um fenótipo similar (Kakimoto, Science 274: 982 - 985, 1996). Os aumentados níveis de citocinina foram descritos como tendo uso como um marcador selecionável

para a transformação de plantas, por exemplo, controle indutível de IPT (patente U.S. número 6.452.068, e patente U.S. número 6.326.192, ambas incorporadas aqui por referência) e controle indutível de ESR-2 (patente U.S. número 6.441.276, incorporada aqui por referência) e ESR1-A (patente U.S. número 6.407.312, incorporada aqui por referência). Na presente invenção, as proteínas relacionadas com a biossíntese de citocinina são preferivelmente expressadas constitutivamente. Estes genes quando usados nos constructos de plasmídeo de DNA da presente invenção como componentes do esqueleto do vetor, induzem formação de calos não-embriogênicos anormais em células de monocotilédones que contêm a estrutura do vetor. Os plasmídeos de DNA da presente invenção são especialmente utilizáveis para a transformação de células de monocotilédones como poucos embriões são produzidos que contêm o DNA do esqueleto. Quando usadas para transformar células de plantas dicotiledôneas, as células contendo os genes biossintéticos de citocinina quiméricos produzem brotos anormais que falham na produção de raízes abundantes. Adicionalmente, as enzimas que degradam citocinina, por exemplo citocinina oxidase (patente U.S. número 6.229.066, incorporada aqui por referência) podem ser usadas na presente invenção para servir como um transgene marcador selecionável negativo não-letal para células de plantas que contêm o esqueleto do vetor.

Auxina, como ácido indol-3-acético (IAA) afeta o crescimento de células de plantas e o desenvolvimento especialmente quando em combinação com outros hormônios de plantas. As variações de relação da concentração de citocinina/ auxina causam uma melhora no crescimento de plantas que ocorre preferivelmente em alguns tecidos. Por exemplo, uma relação elevada citocinina/ auxina promove o crescimento de brotos, enquanto uma relação baixa de citocinina para auxina promove o crescimento de raízes (Depicker et al. (1983) em *Genetic Engineering of Plants*, T. Kosunge, C. P. Meredith e A. Hollaender, eds., Plenum Press, New York, p. 154). As tentativas para aumentar a síntese endógena de IAA têm envolvido a engenharia genética de plantas como contendo genes

18

bacterianos para a biossíntese de IAA. Estes incluem os genes de via biossintética IAA de *Agrobacterium* sp.: *iaaM*, *iaaH*, *rolACB* ou outros genes de raiz pilosa ou tumor isolados das espécies de *Agrobacterium* que funcionam para prover moléculas de auxina.

5 Geralmente, as plantas transgênicas expressando níveis superiores de IAA através de enzimas bacterianas mostraram anormalidades fenotípicas (Klee *et al.* Genes Devel. 1: 86 - 96, 1987; Schmulling *et al.* EMBO J. 7: 2621 - 2629, 1988). Estas plantas transgênicas demonstraram níveis superiores aos normais tanto de conjuntos de IAA
10 como de IAA livre, particularmente quando os genes bacterianos *iaaM* (triptofano monooxigenase) e/ou *iaaH* (indolacetamida hidrolase) foram ligados a promotores heterólogos poderosos (Sitbon, F. (1992) Transgenic Plants Overproducing IAA--A Model System to Study Regulation of IAA Metabolism, Swedish University of Agricultural Sciences, Umea, Sweden). A biossíntese de conjugados de IAA em *Zea mays* é catalisada por UDP-
15 glicose:indol-3-ilacetil-glucosil transferase (EC 2.4.1.121; também chamado de IAA-Glicose Sintetase, IAGlu Sintetase, IAGlu Transferase; patente U.S. números 5.919.998, e 6.489.541, ambas incorporadas aqui por referência). A superexpressão desta enzima causa o crescimento análogo de células em
20 cultura de tecido. A presente invenção contempla o uso de genes biossintéticos de auxina no esqueleto do vetor para prover um fenótipo distintivo para células de plantas contendo o DNA do esqueleto do vetor dos plasmídeos de DNA.

A biossíntese de etileno foi estabelecida, metionina é convertida
25 para etileno com S-adenilmetionina (SAM) e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como intermediários. A produção de ACC de SAM é catalisada pela enzima sintase ACC. ACC sintase é produzida no amadurecimento de frutas e plantas estressadas e é codificada por uma família de genes altamente divergentes (patente U.S. número 5.723.766,
30 incorporada aqui por referência). A conversão de ACC para etileno é catalisada por enzima formadora de etileno (EFE), (Spanu *et al.*, EMBO J 1991, 10, 2007. Por exemplo, genes de ácido 1-aminociclopropano-1-

carboxílico sintase (ACS) e de enzima formadora de etileno (EFE) isolados como descrito na patente U.S. número 5.886.164, incorporada aqui por referência. ACC oxidase, que converte ACC em etileno, é expressada constitutivamente na maior parte dos tecidos (Yang *et al.*, Ann. Rev. Plant

5 Physiol. 1984, 35, 155), mas é induzida durante o amadurecimento da fruta (Gray *et al.* Cell 1993 72, 427), composições de proteína e DNA de ACC oxidase ou homólogos dos mesmos são utilizáveis como descritos na patente U.S. número 6.043.409, incorporada aqui por referência. Os

10 constructos de DNA da presente invenção contemplam a presença de um cassete de expressão de planta no esqueleto do vetor que provê a superexpressão de enzimas biossintéticas de etileno em células de plantas que contêm o DNA do esqueleto do vetor. Uma enzima ACC deaminase metaboliza ACC por conversão em alfa-cetobutirato e amônia (patente U.S. número 5.702.933, incorporada aqui por referência). Plantas transformadas

15 para expressar a enzima ACC deaminase têm reduzidos níveis de etileno em seus tecidos. As plantas transformadas que foram modificadas com um receptor insensível a etileno ETR-1 são caracterizadas por uma diminuição na resposta de etileno como comparado com uma planta não contendo receptor insensível (patente U.S. número 5.689.055, incorporada aqui por

20 referência). Os constructos de DNA da presente invenção contemplam a presença de um cassete de expressão de plantas no esqueleto do vetor que provê superexpressão de enzimas degradativas de etileno ou proteínas de receptor insensível a etileno em células de plantas que contêm o DNA do esqueleto do vetor.

25 Pensa-se que o hormônio de planta de ácido abscísico (ABA) desempenha um papel durante a embriogênese tardia, principalmente no estágio de maturação por inibição da germinação durante a embriogênese (In *Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry*, W. J. Davies e H. G. Jones, eds. (Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd.), pp. 99 - 124, 1991). Mutações

30 que afetam o desenvolvimento da semente e são insensíveis a ABA foram identificadas em *Arabidopsis* e milho. O mutante insensível a ABA (*abi3*) de *Arabidopsis* e o mutante vivíparos 1 (*vp1*) de milho são detectados

3/2

principalmente durante a embriogênese tardia (McCarty, *et al.*, Plant Cell 1, 523 - 532, 1989, e Parcy *et al.*, Plant Cell 6, 1567 - 1582, 1994). Tanto o gene VP1 como os genes ABI3 foram isolados e verificou-se que compartilham regiões conservadas (Giraudat, J. Current Opinion in Cell Biology 7: 232 - 238, 1995, e McCarty, D. R. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 71 - 93, 1995). O gene VP1 foi mostrado como funcionando como um ativador de transcrição (McCarty *et al.*, Cell 66: 895 - 906, 1991). Foi sugerido que ABI3 tem uma função similar. Os genes LEC1 e moléculas de mutantes relacionados descritos na patente U.S. número 6.320.102 (incorporada aqui por referência), isto é, lec2, fus3-3 e abi3-3 que causam defeitos similares em embriogênese tardia para os de lec1-1 ou lec1-2. Estes mutantes são intolerantes à dessecação, às vezes são vivíparos e têm meristemas apicais de brotos ativados. Os mutantes lec2 e fus3-3 são sensíveis a ABA e possuem tricomas em seus cotilédones e, assim, podem ser categorizados como mutantes de tipo cotilédone folhoso. Os mutantes abi3-3 pertencem a uma classe diferente de mutações defeituosas em embrião tardio que são insensíveis a ABA e não têm tricomas nos cotilédones. Os constructos de DNA da presente invenção contemplam a presença de um cassete de expressão de plantas no esqueleto do vetor que provê superexpressão de proteínas relacionadas com ABA em células de plantas que contêm o DNA do esqueleto do vetor, assim provendo um meio para distinguir em célula de planta em cultura de tecido com e sem o esqueleto do vetor.

O gene Bas1 em *Arabidopsis* codifica um citocromo P450 (CYP72B1), que tem um papel na síntese ou sinalização de brassinoesteróide. A superexpressão do gene Bas1 em plantas causa um fenótipo de ananismo, verde escuro, que imita plantas que têm níveis baixos de hormônio de planta, brassinolídeo (publicação da patente U.S. número US 20020073446, incorporada aqui por referência). Este gene e outros produtos gênicos de sinalização de hormônio de planta podem ser usados na presente invenção para prover um fenótipo aberrante para as plantas contendo o segmento de DNA do esqueleto do vetor compreendendo estes

genes como o transgene marcador selecionável negativo não-letal.

Os genes de interferência metabólica incluem seqüências de codificação que codificam para uma proteína que tem atividade catalítica em um substrato de célula de planta endógeno, ainda é não-letal para a célula.

5 O substrato inclui, mas não é limitado a açúcares simples, ácidos graxos, aminoácidos, ou nucleotídeos. Assim, os genes de interferência metabólica codificam, por exemplo, enzimas de via biossintética, enzimas que divergem substratos das vias, enzimas que degradam ou inativam substratos das vias, ou produtos gênicos que afetam a expressão das enzimas da via, estes podem incluir moléculas de RNA anti-sentido ou intensificadores ou repressores de transcrição. Mais especificamente, os exemplos de proteínas de interferência metabólica incluem mas não são limitados a levansucrase, invertase, e trehalose sintase. A expressão de gene de interferência metabólica altera a ocorrência normal ou distribuição do substrato na célula

10 de planta. O resultado é uma célula que é reduzida na divisão celular, alongamento da célula, ou regeneração em uma planta. Um gene de interferência metabólica pode compreender uma seqüência anti-sentido complementar a um gene de célula de planta endógeno ou transcrito que quando expressado em uma célula de planta resulta em divisão de célula de

15 planta reduzida, alongamento da célula, ou regeneração em uma planta. Os constructos de DNA da presente invenção contemplam a presença de um cassete de expressão de planta no esqueleto do vetor que provê uma superexpressão de enzimas de interferência metabólica ou um RNA anti-sentido que funciona como molécula repressiva de processos metabólicos em células de plantas que contêm o DNA do esqueleto do vetor. O

20 constructo de DNA pode ser feito para prover um RNA anti-sentido que forma uma molécula de RNA de filamento duplo quando expressada em células de plantas e provê para a supressão de genes pós-transcricional de um gene hospedeiro de marcação.

30 Um gene geralmente refere-se a um segmento de DNA que está envolvido na produção de um polipeptídeo. Este segmento de DNA inclui moléculas regulatórias precedendo (moléculas de DNA de não-codificação

32

5') e seguindo (moléculas de DNA de não-codificação 3') a região de codificação, assim como seqüências intervenientes (íntrons) entre os segmentos de codificação individuais (éxons). Um "gene nativo" significa um gene como encontrado na natureza com suas próprias seqüências de DNA regulatórias. "Gene quimérico" significa qualquer gene que não é um gene nativo, compreendendo seqüências de codificação e regulatórias heterólogas que não são encontradas juntas na natureza. Conseqüentemente, um gene quimérico pode compreender seqüências regulatórias e seqüências de codificação que são derivadas de fontes diferentes, ou seqüências regulatórias e seqüências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas em um modo diferente do encontrado na natureza. Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação resultando em um organismo transgênico. Um transgene também pode ser construído para produzir um produto gênico que não codifica para um polipeptídeo, por exemplo um RNA anti-sentido.

As seqüências regulatórias genéticas são componentes do gene e quando ligadas como um transgene incluem moléculas de polinucleotídeos localizadas a montante (seqüências de não-codificação 5'), dentro, ou a jusante (seqüências não-traduzidas 3') de uma seqüência de polinucleotídeo estrutural, e que influencia a transcrição, processamento ou estabilidade de RNA, ou tradução da seqüência de polinucleotídeo estrutural associada. As seqüências regulatórias podem incluir promotores, seqüências líder de tradução (por exemplo patente U.S. número 5.659.122), íntrons (por exemplo, patente U.S. número 5.424.412), e seqüências de reconhecimento de poliadenilação.

O constructo de DNA da presente invenção pode, em uma modalidade, conter um promotor que causa a superexpressão do produto de transgene da presente invenção, onde a "superexpressão" significa a expressão do produto ou não normalmente presente na célula hospedeira, ou presente na referida célula hospedeira em um nível maior do que normalmente expressado do gene endógeno codificando o referido

33
M

polipeptídeo. Os promotores, que podem causar a superexpressão do produto transgene da presente invenção, são geralmente conhecidos na técnica, por exemplo, promotores virais (P-CaMV35S, patente U.S. número 5.352.605; P-FMV35S, patente U.S. números 5.378.619 e 5.018.100), e

5 vários promotores derivados de planta, por exemplo, promotores de actina de plantas (P-Os.Act1, patentes U.S. números 5.641.876 e 6.429.357). Estes promotores são exemplos de promotores constitutivos que geralmente expressam na maior parte dos tecidos da planta. Outros promotores constitutivos são bem conhecidos dos versados na técnica de biologia

10 molecular e são utilizáveis na presente invenção.

O nível de expressão ou padrão do promotor do constructo de DNA da presente invenção pode ser modificado para melhorar sua expressão. Os métodos bem conhecidos dos versados na técnica podem ser usados para inserir elementos melhoradores (por exemplo subdomínios

15 do promotor CaMV35S, Benfey *et al.*, EMBO J. 9: 1677 - 1684, 1990) na sequência 5' dos genes. Em uma modalidade, os elementos intensificadores podem ser adicionados para criar um promotor, que engloba a expressão temporal e espacial do promotor nativo do gene da presente invenção mas têm níveis quantitativamente maiores de expressão. Similarmente, a

20 expressão específica para tecido do promotor pode ser obtida através de modificações da região 5' do promotor com elementos determinados para ativar ou reprimir especificamente a expressão de gene (por exemplo, elementos específicos para pólen, Eyal *et al.*, 1995 Plant Cell 7: 373 - 384). O termo "sequência de promotor" ou "promotor" significa uma molécula de

25 polinucleotídeo que é capaz de, quando localizada em *cis* para uma sequência de polinucleotídeo estrutural codificando um polipeptídeo, funcionar em um modo que dirige a expressão de uma ou mais moléculas de mRNA que codifica o polipeptídeo. Estas regiões de promotor são tipicamente encontradas a montante do trinucleotídeo, ATG, no sítio de

30 partida de uma região de codificação de polipeptídeo. As moléculas de promotor também incluem sequências de DNA das quais a transcrição de um RNA de transferência (tRNA) ou sequências de RNA ribossômico

(rRNA) são iniciadas. A transcrição envolve a síntese de uma cadeia de RNA representando um filamento de um duplex de DNA. A sequência de DNA requerida para a reação de terminação de transcrição é chamada a região de terminação de transcrição 3'.

5 Prefere-se que o promotor particular selecionado deva ser capaz de causar uma expressão suficiente para resultar na produção de uma quantidade eficaz de um produto para causar o fenótipo desejado. Além dos promotores que são conhecidos como causando a transcrição de DNA em células de plantas, outros promotores podem ser identificados para
10 uso na presente invenção por triagem de uma biblioteca de cDNA de planta para genes que são seletivamente ou preferivelmente expressados nos tecidos de marcação e então determinam as regiões de promotor. Os promotores que expressam o produto gênico marcador selecionável negativo não-letal ligado durante o processo de cultura de tecido de planta
15 para regenerar uma célula de planta em uma planta são especialmente utilizáveis na presente invenção.

Os promotores que podem ser usados para expressar transgenes em plantas podem ser derivados de genes codificando proteínas de armazenamento embrionário, que inclui o gene codificando a proteína de
20 armazenamento de 2S de *Brassica napus* (Dasgupta *et al.*, Gene 133: 301 - 302, 1993); a família de gene de proteína de armazenamento de semente 2S de *Arabidopsis* ; o gene codificando oleosina 20kD (kilodalton) de *Brassica napus* (GenBank M63985); os genes codificando oleosina A (GenBank U09118) e oleosina B (GenBank U09119) de soja; o gene
25 codificando oleosina de *Arabidopsis* (GenBank Z17657); o gene codificando oleosina 18kD de milho (GenBank J05212, Lee, Plant Mol. Biol. 26: 1981 - 1987, 1994) e o gene codificando proteína rica em enxofre de baixo peso molecular de soja (Choi *et al.*, Mol. Gen. Genet. 246: 266 - 268, 1995), podem ser usados em transgenes quiméricos. Os promotores derivados de
30 genes codificando zeína (incluindo os genes 15kD, 16kD, 19kD, 22kD, 27kD, e gama, Pedersen *et al.*, Cell 29: 1015 - 1026, 1982) podem ser usados em transgenes quiméricos. As zeínas são um grupo de proteínas de

armazenamento encontrado em endosperma de milho. Os promotores que expressam em tecido de semente são aqui referidos como P-Seed, salvo identificados em contrário.

Reconhece-se que promotores adicionais que podem ser usados são descritos, por exemplo, nas patentes U.S. números 5.378.619, 5.391.725, 5.428.147, 5.447.858, 5.608.144, 5.608.144, 5.614.399, 5.633.441, 5.633.435, e 4.633.436, todas sendo aqui incorporadas em sua totalidade. Reconhece-se ainda que os limites exatos de seqüências regulatórias não podem ser completamente definidos e que os fragmentos de DNA de diferentes comprimentos podem ter uma atividade de promotor idêntica. Os versados na técnica podem identificar promotores além dos aqui descritos que funcionam na presente invenção para prover expressão de uma molécula de polinucleotídeo de transgene marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta.

A seqüência líder de tradução é um meio de elemento genético de DNA localizado entre a seqüência de promotor de um gene e a seqüência de codificação. A seqüência de líder de tradução está presente no mRNA completamente processado a montante da seqüência de início de tradução. A seqüência líder de tradução pode afetar o processamento do transcrito primário para mRNA, estabilidade de mRNA ou eficácia de tradução. Os exemplos de seqüências líder de tradução incluem líderes de proteína de choque térmico de milho e petúnia (patente U.S. número 5.362.865, incorporada aqui por referência), líderes de proteína de revestimento de vírus de planta, líderes de gene rubisco de planta, dentre outros (Turner e Foster, Molecular Biotechnology 3: 225, 1995).

Os peptídeos de trânsito geralmente se referem a moléculas de peptídeo que, quando ligadas a uma proteína de interesse, dirigem a proteína para um tecido, célula, local subcelular ou organela de células particulares. Os exemplos incluem, mas não são limitados a peptídeos de trânsito de cloroplasto, sinais de marcação nuclear, e sinais vacuolares. O peptídeo de trânsito de cloroplasto é de utilidade particular na presente invenção para dirigir a expressão da enzima fitoeno sintase para o

cloroplasto. Os peptídeos de trânsito de cloroplasto (CTPs) são engenheirados para serem fundidos nas proteínas de N-término a serem marcados no cloroplasto da planta. Muitas proteínas localizadas no cloroplasto são expressadas a partir de genes nucleares como precursores e são marcados para o cloroplasto por um peptídeo de trânsito de cloroplasto (CTP) que é removido durante as etapas de importação. Os exemplos de proteínas de cloroplastos incluem a subunidade pequena de ribulose-1,5,-bisfosfato carboxilase (RbcS2, rubisco), ferredoxina, ferredoxina oxidoreductase, a proteína I e proteína II de complexo de colheita leve, e tiorredoxina F. Foi demonstrado in vivo e in vitro que as proteínas não-cloroplasto podem ser marcadas para o cloroplasto pelo uso de fusões de proteína com um CTP e que uma sequência de CTP é suficiente para marcar uma proteína para o cloroplasto. A incorporação de um peptídeo de trânsito de cloroplasto apropriado, como, EPSPS CTP de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al.*, Mol. Gen. Genet. 210: 437 - 442, 1987), e *Petunia hybrida* EPSPS CTP (della-Cioppa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6873 - 6877, 1986) foi demonstrada como marcando a proteína heteróloga para os cloroplastos em plantas transgênicas. A expressão de uma enzima fitoeno sintase em plantas transgênicas é marcada para o cloroplasto pela adição de um CTP (WO 9714807, patente U.S. número 6.429.356, incorporada aqui por referência). Os versados na técnica irão reconhecer que vários constructos quiméricos podem ser feitos que utilizam a funcionalidade de um CTP particular para importar fitoeno sintase ou outros produtos gênicos marcadores selecionáveis negativos não-letais no cloroplasto da célula de planta, como necessário.

As sequências não-traduzidas 3' ou região de terminação 3' significa sequências de DNA localizadas a jusante de uma sequência de nucleotídeo estrutural e incluem sequências codificando sinais de poliadenilação e outros regulatórios capazes de afetar a transcrição, processamento de mRNA ou expressão de genes. O sinal de poliadenilação funciona em plantas para causar a adição de poliadenilato nucleotídeos para a extremidade 3' do precursor de mRNA. A sequência de

37

poliadenilação pode ser derivada de gene natural, de uma variedade de genes de plantas, ou de T-DNA. Um exemplo da seqüência de poliadenilação é a seqüência nopalina sintase 3' (nos 3'; Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 - 4807, 1983). O uso de seqüências não-

5 traduzidas 3' diferentes é exemplificado por Ingelbrecht *et al.*, (Plant Cell 1: 671 - 680, 1989).

Os procedimentos de laboratório em tecnologia de DNA recombinante usados aqui são os bem conhecidos dos versados na técnica e comumente empregados. As técnicas padrão são usadas para clonagem,

10 isolamento de DNA e RNA, amplificação e purificação. Geralmente, as reações enzimáticas envolvendo DNA ligase, DNA polimerase, endonucleases de restrição, e similares, são realizadas de acordo com as especificações dos fabricantes. Estas técnicas e várias outras técnicas geralmente são realizadas de acordo com Sambrook *et al.*, Molecular

15 Cloning - A Laboratory Manual, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989), referido aqui como Sambrook *et al.*, (1989).

Constructo de DNA recombinante de plantas e plantas transformadas

20 As moléculas de ácido polinucleico isoladas da presente invenção podem encontrar uso particular na criação de plantas de cultura transgênica em que os polipeptídeos da presente invenção são superexpressados. A superexpressão destes polipeptídeos em uma célula de plantas pode reduzir a taxa em que a célula de planta regenera em uma

25 planta intacta ou produz um fenótipo facilmente discernível ao olho nu sem a adição de substratos exógenos. O plasmídeo de DNA da presente invenção pode ser transformado em uma célula de planta de cultura transgênica.

Uma planta de cultura transgênica contém uma molécula de polinucleotídeo exógena inserida no genoma de uma célula de planta de

30 cultura. Uma célula de planta de cultura, inclui sem limitação uma célula de planta ainda compreendendo culturas em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos,

esporófitos, óvulos, pólen e microesporos, e sementes, e fruta. Por "exógeno", significa-se que uma molécula de polinucleotídeo se origina de fora da planta em que a molécula de polinucleotídeo foi introduzida. Uma molécula de polinucleotídeo exógena pode ter uma seqüência de

5 nucleotídeo de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. Um versado na técnica entende que uma molécula de polinucleotídeo exógeno pode ser uma molécula heteróloga derivada de uma espécie diferente do que a planta em que a molécula de polinucleotídeo foi introduzida ou pode ser uma molécula de polinucleotídeo derivada da mesma espécie de planta como a

10 planta em que foi introduzida. O polinucleotídeo exógeno (transgene) quando expressado em uma planta transgênica pode prover um traço agronomicamente importante. Os transgenes de interesse agrônômico (GOI) provêm traços agrônômicos benéficos em plantas de cultura, por exemplo, mas não são limitados aos elementos genéticos compreendendo

15 resistência a herbicida (patente U.S. número 5.633.435; patente U.S. número 5.463.175), rendimento aumentado (patente U.S. número 5.716.837), controle de insetos (patente U.S. número 6.063.597; patente U.S. número 6.063.756; patente U.S. número 6.093.695; patente U.S. número 5.942.664; patente U.S. número 6.110.464), resistência a doenças

20 fúngicas (patente U.S. número 5.516.671; patente U.S. número 5.773.696; patente U.S. número 6.121.436; e patente U.S. número 6.316.407, e patente U.S. número 6.506.962), resistência a vírus (patente U.S. número 5.304.730 e patente U.S. número 6.013.864), resistência a nematóides (patente U.S. número 6.228.992), resistência a doença bacteriana (patente U.S. número

25 5.516.671), produção de amido (patente U.S. número 5.750.876 e patente U.S. número 6.476.295), produção de óleos modificados (patente U.S. número 6.444.876), produção de óleo elevada (patente U.S. número 5.608.149 e patente U.S. número 6.476.295), teor de ácido graxo modificado (patente U.S. número 6.537.750), produção de proteína elevada

30 (patente U.S. número 6.380.466), amadurecimento de fruta (patente U.S. número 5.512.466), nutrição humana e animal melhorada (patente U.S. número 5.985.605 e patente U.S. número 6.171.640), biopolímeros (patente

U.S. número 5.958.745 e publicação da patente U.S. número US 20030028917), resistência a estresse ambiental (patente U.S. número 6.072.103), peptídeos farmacêuticos (patente U.S. número 6.080.560), melhorados traços de processamento (patente U.S. número 6.476.295),
5 melhorada digestibilidade (patente U.S. número 6.531.648) baixo teor de rafinose (patente U.S. número 6.166.292), produção de enzima industrial (patente U.S. número 5.543.576), aroma melhorado (patente U.S. número 6.011.199), fixação de nitrogênio (patente U.S. número 5.229.114), produção de sementes híbridas (patente U.S. número 5.689.041), e
10 produção biocombustível (patente U.S. número 5.998.700), os elementos genéticos e transgenes descritos nas patentes listadas acima são aqui incorporados por referência.

A presente invenção também provê um constructo de DNA recombinante de planta para produzir plantas de cultura transgênicas. Os
15 métodos que são bem conhecidos dos versados na arte podem ser usados para preparar o constructo de DNA recombinante de planta de cultura da presente invenção. Estes métodos incluem técnicas de DNA recombinante in vitro, técnicas sintéticas, e recombinação genética in vivo. Estas técnicas são descritas em Sambrook *et al.*, (1989). As moléculas de polinucleotídeos
20 exógenos criadas pelos métodos podem ser transferidas em uma célula de planta de cultura por transformação mediada por *Agrobacterium* ou outros métodos bem conhecidos dos versados na técnica de transformação de plantas.

Os constructos de DNA são geralmente constructos de DNA de
25 borda de plasmídeo Ti duplo que tem as regiões de borda direita (RB ou AGRtu.RB) e borda esquerda (LB ou AGRtu.LB) do plasmídeo Ti isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* compreendendo um T-DNA (DNA de transferência), que junto com as moléculas de transferência providas pelas células de *Agrobacterium*, permite a integração do T-DNA no genoma de
30 uma célula de planta. Os constructos de DNA também contém os segmentos de DNA do esqueleto do vetor que provêm função de replicação e seleção de antibiótico em células bacterianas, por exemplo,

40
B

uma origem de *E. coli* de replicação, como *ori322*, uma origem de faixa hospedeiro ampla de replicação como *Ec.oriV* ou *oriRi*, e uma região de codificação para um marcador selecionável como Spec/Strp, que codifica para um gene marcador selecionável Tn7 aminoglicosídeo adeniltransferase

5 (aadA) conferindo resistência a espectinomicina ou estreptomicina, ou uma gentamicina (Gm, Gent). Para transformação de plantas, a cepa bacteriana hospedeira é com frequência *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, ou LBA4404, no entanto, outras cepas bem conhecidas dos versados na técnica de transformação de plantas podem funcionar na presente invenção.

10 A presente invenção provê constructos de DNA que contém um cassete de expressão de planta no esqueleto do vetor, que quando expressadas em uma célula de planta produz um produto não-letal que preferivelmente reduz a regeneração eficaz da célula de planta em uma planta intacta completa ou produz uma planta ou parte da mesma que tem um fenótipo aberrante.

15 Um T-DNA do constructo de DNA da presente invenção irá tipicamente compreender um ou mais transgenes de interesse agrônômico e um marcador selecionável positivo que confere um fenótipo selecionável em células de plantas. O marcador pode prover resistência a um composto de seleção positivo, por exemplo resistência a antibiótico (por exemplo,

20 canamicina, G418, bleomicina, higromicina, etc.), ou resistência a herbicida (por exemplo, incluindo mas não limitados a: inibidores de glifosato, glufosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinila, delapon, ciclohezanodiona, protoporfirionogênio oxidase, e herbicidas isoxasflutole). As moléculas de polinucleotídeo codificando proteínas envolvidas em

25 tolerância a herbicidas são conhecidas na técnica e incluem, mas não são limitadas a uma molécula de polinucleotídeo codificando 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, descrito nas patentes U.S. números 5.627.061, 5.633.435, 6.040.497; Padgett *et al.* *Herbicide Resistant Crops*, Lewis Publishers, 53 - 85, 1996; e Penaloza-Vazquez, *et al.* *Plant Cell Reports* 14: 482 - 487, 1995; e *aroA* (patente U.S. número 5.094.945) para tolerância a glifosato; bromoxinil nitrilase (*Bxn*) para tolerância a Bromoxinil (patente U.S. número 4.810.648); fitoeno desaturase

30

4/1/18

(*ctrl*, Misawa et al. (1993) *Plant J.* 4: 833 - 840, e (1994) *Plant J.* 6: 481 - 489); para tolerância a norflurazon, ácido acetohidróxi sintase (AHAS, *aka* ALS, Sathasiivan et al. *Nucl. Acids Res.* 18: 2188 - 2193, 1990); e o gene *bar* para tolerância a glufosinato e bialafos (DeBloc, et al. *EMBO J.* 6: 2513 - 2519, 1987).

Além de um marcador selecionável, pode ser desejável usar um gene repórter. Em alguns casos, um gene repórter pode ser usado com ou sem um marcador selecionável. Os genes repórter são genes que não estão tipicamente presentes no organismo recipiente ou tecido e tipicamente codificam para proteínas resultando em mudança fenotípica ou propriedade enzimática. Os exemplos destes genes são providos em Wising et al. *Ann. Rev. Genetics*, 22, 421 (1988), que é incorporado aqui por referência. Os genes repórter incluem beta-glucuronidase (GUS) de locus *uidA* de *E. coli*, o gene cloranfenicol acetil transferase de Tn9 de *E. coli*, a proteína fluorescente verde de água-viva bioluminescente *Aequorea victoria*, e o gene luciferase de vaga-lume *Photinus pyralis*. Um teste para detectar a expressão de gene repórter pode então ser realizado a um tempo apropriado após referido gene ter sido introduzido em células recipientes. Um tal teste preferido acarreta o uso do gene codificando beta-glucuronidase (GUS) do locus *uidA* de *E. coli* como descrito por Jefferson et al., (*Biochem. Soc. Trans.* 15, 17 - 19, 1987) para identificar células transformadas, referidas aqui como GUS.

O constructo de DNA da presente invenção pode ser introduzida no genoma de um hospedeiro de planta desejado por um método de transformação de planta mediado por *Agrobacterium* apropriado. Os constructos de plasmídeo de transformação de plantas apropriadas para o fim de transformação mediada por *Agrobacterium* incluem as derivadas de plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, assim como os descritos, por exemplo, por Herrera-Estrella et al., (*Nature* 303: 209, 1983); Bevan, (*Nucleic Acids Res.* 12: 8711 - 8721, 1984); Klee et al., (*Bio-Technology* 3: 637 - 642, 1985). Métodos para transformar plantas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* incluem Fraley et al.,

42

- (Bio/Technology 3: 629 - 635, 1985), e Rogers *et al.*, (Methods Enzymol. 153: 253 - 277, 1987). A transformação mediada por *Agrobacterium* é obtida através do uso de uma bactéria de solo geneticamente engenheirada pertencendo ao gênero *Agrobacterium*. Várias espécies de *Agrobacterium* mediam a transferência de um DNA específico conhecido como "T-DNA", que pode ser geneticamente engenheirado para transportar qualquer peça desejada de DNA em muitas espécies de plantas. Os eventos principais marcando o processo de patogênese mediada por T-DNA são indução de genes de virulência, e processamento e transferência de T-DNA. Este processo é o assunto de muitas revisões de estudo (Ream. Ann. Rev. Phytopathol. 27: 583 - 618, 1989; Howard e Citovsky, Bioassays, 12: 103 - 108, 1990; Kado, Crit. Rev. Plant Sci. 10: 1 - 32, 1991; Winnans, Microbiol. Rev. 56: 12 - 31, 1992; Zambryski, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 43: 465 - 490, 1992; Gelvin, In *Transgenic Plants*, S. D. Kung e R. Wu eds., Academic Press, San Diego, pp. 49 - 87, 1993; Binns e Howitz, In *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals* (Dang, J. L., ed.). Berlin: Stringer Verlag, pp. 119 - 138, 1994; Hooykaas e Beijersbergen, Ann. Rev. Phytopathol. 32: 157 - 179, 1994; Lessl e Lanka, Cell 77: 321 - 324, 1994; Zupan e Zambryski, Ann. Rev. Phytopathol. 27, 583 - 618, 1995).
- As técnicas de regeneração de célula de planta se baseiam na manipulação de alguns fitohormônios em um meio de crescimento de cultura de tecido, também tipicamente se baseando em um marcador de biocida e/ou herbicida que foi introduzido junto com as seqüências de nucleotídeos desejadas. A escolha de metodologia com os protocolos apropriados sendo disponível para hospedeiros Leguminosae (alfafa, feijão de soja, trevos, etc.), Umbelliferae (cenoura, aipo, pastinaca), Cruciferae (repolho, rabanete, canola/ colza de semente oleígena, etc.), Cucurbitaceae (melões e pepino), Gramineae (trigo, cevada, arroz, milho, etc.), Solanaceae (batata, tabaco, tomate, pimentões), várias culturas florais, como girassol, e árvores contendo nozes, como amendoeiras, cajueiros, nogueiras, e nogueira-pecã. Ver, por exemplo, Ammirato *et al.*, Handbook of Plant Cell Culture - Crop Espécie. Macmillan Publ. Co. (1984); Shimamoto *et al.*,

43

Nature 338: 274 - 276 (1989); Fromm, UCLA Symposium on Molecular Strategies for Crop Improvement, 16 - 22 de abril, 1990. Keystone, CO (1990); Vasil *et al.*, Bio/Technology 8: 429 - 434 (1990); Vasil *et al.*, Bio/Technology 10: 667 - 674 (1992); Hayashimoto, Plant Physiol. 93: 857 - 863 (1990); e Datta *et al.*, Bio-technology 8: 736 - 740 (1990). Tais técnicas de regeneração são geralmente descritas em Klee *et al.*, Ann. Rev. Plant Phys. 38: 467 - 486 (1987). Métodos e composições para transformar plantas por introdução de um constructo de DNA transgênico em um genoma de planta na prática desta invenção podem incluir qualquer um dos métodos bem conhecidos e demonstrados. Por exemplo, transformação mediada por *Agrobacterium* como ilustrado nas patentes U.S. números 5.824.877; 5.591.616; e 6.384.301, todas são incorporadas aqui por referência.

As plantas que podem ser feitas pela prática da presente invenção incluem, mas não são limitadas a acácia, alfafa, aneth, maçã, damasco, alcachofra, arugula, aspargo, abacate, banana, cevada, feijões, beterraba, amora-preta, mirtilo, brócolis, couve-de-bruxelas, repolho, canola, cantaloupe, cenoura, mandioca, couve-flor, aipo, cereja, cilantro, cítricos, clementines, café, milho, algodão, pepino, abeto Douglas, berinjela, endívias, escarola, eucalipto, erva-doce, figo, árvores de florestas, cabaço, uvas, toronja, melão doce, jicama, kiwi, alface, alho-porró, limão, lima, pinheiro Loblolly, manga, melão, cogumelo, noz, aveia, okra, cebola, laranja, uma planta ornamental, papaia, salsinha, ervilha, pêssego, amendoim, pêra, pimentão, caqui, pinheiro, abacaxi, tipo de banana, ameixa, romã, álamo, batata, abóbora, marmelo, pinheiro radiata, radicchio, rabanete, framboesa, arroz, centeio, sorgo, pinheiro do sul, soja, espinafre, jerimu, morango, beterraba de açúcar, cana-de-açúcar, girassol, batata doce, goma doce, tangerina, chá, tabaco, tomate, turfa, um vinhedo, melancia, trigo, inhame, e zucchini.

Os seguintes exemplos são providos para melhor elucidar a prática da presente invenção e não devem ser interpretados em qualquer modo para limitar o escopo da presente invenção. Os versados na técnica

irão reconhecer que várias modificações, adições, substituições, trucações, etc, podem ser feitos aos métodos e genes descritos aqui apesar de não saírem do espírito e escopo da presente invenção.

EXEMPLOS

5 Exempo 1

Plasmídeos de DNA

Os plasmídeos de DNA da presente invenção são constructos de DNA que contém um segmento de t-DNA e uma segmento do esqueleto do vetor. O T-DNA é flanqueado por regiões de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium* as regiões de borda direita (RB) e de borda esquerda (LB)] e contém genes de marcador selecionável positivo e genes de interesse agrônômico (GOI). O segmento do esqueleto do vetor contém o gene marcador selecionável negativo não-letal e os elementos de manutenção de plasmídeos. Os plasmídeos de DNA usados como controles para fins comparativos contém cassetes de expressão de T-DNA idênticos ou similares, mas não contém o gene marcador selecionável negativo não-letal do esqueleto do vetor. O projeto básico de um plasmídeo da presente invenção é ilustrado na figura 1. Nesta ilustração, os elementos RB e LB flanqueiam um T-DNA, estes elementos de borda podem ser substituídos com outro como os elementos ou fragmentos de moléculas de DNA relacionadas que funcionam como sítios de corte "nick" para uma endonuclease provida pelo genes de virulência de *Agrobacterium*. O gene marcador selecionável pode ser selecionado dentre qualquer número de genes conhecidos como provendo resistência à célula de planta para compostos de seleção positiva como, antibióticos, por exemplo canamicina, higromicina, gentamicina, ou herbicidas, por exemplo, inibidores de glifosato, glufosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinila, delapon, ciclohezanodiona, protoporfirionogênio oxidase, e herbicidas isoxaflutol. Os genes de interesse agrônômico podem ser selecionados para prover qualquer número de traços utilizáveis para as plantas. A presente invenção provê exemplos de genes de interesse agrônômico em constructos de DNA que incluem, mas não são limitadas a um gene de tolerância a herbicida,

45

genes de resistência a insetos, e um gene de melhora do rendimento.

Um constructo de DNA especificamente utilizável para expressão em células de plantas monocotiledôneas contém a sequência de codificação de DNA *crtB* com um líder de peptídeo de trânsito de cloroplasto de subunidade rubisco ligada (SSU, TS-Ps.RbcS2, SEQ ID NO: 1 de patente U.S. número 6.429.356, incorporada aqui por referência) é ligado de modo operativo a um promotor constitutivo forte (P-CaMV.35Sen, patente U.S. número 5.359.142, promotor CaMV com melhorador duplicado) e milho Hsp70 intron (I-Zm.DnaK, patente U.S. número 5.593.874) e uma região de terminação 3' isolada do gene nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos 3') como ilustrado em pMON80101 (figura 2), este cassete de expressão está localizado no segmento de DNA do esqueleto do vetor. Em pMON80101, o T-DNA contém um cassete de expressão de planta que é tanto um marcador selecionável como um gene de interesse agrônômico (tolerância a glifosato). Este cassete de expressão compreende o promotor, líder, e intron de actina 1 de arroz (P-Os.Act1, patente U.S. número 5.641.876), ligado ao peptídeo de trânsito de cloroplasto (CTP2) isolado de gene ShkF de *Arabidopsis*, ligado à sequência de codificação *aroA*-CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (patente U.S. número 5.633.435), ligado à região de terminação 3' isolada do gene nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*.

Um constructo de DNA contendo a sequência de codificação de *crtB* codificando uma fitoeno sintase (SEQ ID NO: 1 da presente invenção, ou outras moléculas de DNA codificando uma fitoeno sintase, por exemplo SEQ ID NO: 1 de patente U.S. número 6.429.356) é construída que é particularmente utilizável para a expressão em células de plantas dicotiledôneas é ilustrada em pMON77406 (figura 3). O promotor P-CaMV.35S:en é um promotor constitutivo forte que dirige a expressão do produto gênico *crtB* em células de plantas. Este constructo contém o cassete de expressão de gene marcador selecionável (P-FMV35S/L-Ph-Hsp70/CTP2-*aroA*-CP4/T-RbcS2-E9) que provê uma expressão constitutiva forte de uma enzima EPSPS resistente a glifosato (*aroA*-CP4). O promotor

46

P-FMV (patente U.S. número 5.378.619), o líder de tradução isolado de gene Hsp70 de *Petunia hybrida* (patente U.S. número 5.362.865), o peptídeo de trânsito de cloroplasto (CTP2) isolado de EPSPS de *Arabidopsis* ligado de modo operativo à seqüência de codificação de EPSPS resistente a glifosato *aroA*-CP4 e ligado à região de terminação 3' de subunidade pequena rubisco de ervilha também referido como E9. Os cassetes de expressão adicionais (transgenes de interesse agrônômico) podem ser adicionados no T-DNA de modo a prover melhorados fenótipos agrônômicos nas plantas transgênicas contendo o T-DNA.

10 Um constructo de DNA ilustrado na figura 4 (pLAGILB01.0033) contém um transgene melhorador de rendimento (P-Seed/I-Zm.DnaK-Hsp70/Cglut.CordapA/T-AGRtu.Tr7) e o gene marcador selecionável glifosato. O promotor P-Seed funciona para prover a expressão em tecidos de semente ligados a íntron Hsp70 de milho. O gene CordapA
15 (*Corynebacterium* dapA, Bonnassie *et al.* Nucleic Acids Res. 18: 6421, 1990) codifica uma enzima DHAPS que é insensível ao inibidor lisina. A região de terminação de transcrição é do gene Tr7 de *Agrobacterium tumefaciens*. O transgene marcador selecionável negativo não-letal *crtB* está localizado no DNA do esqueleto do vetor.

20 Um constructo de DNA ilustrado na figura 5 (pLAGILB01.0037) contém dois transgenes de resistência a insetos, os polinucleotídeos que codificam uma proteína Bt.EG11768 (patente U.S. número 6.242.241) e uma proteína Bt.cryIIAb (patente U.S. número 6.489.542). O gene *crtB* está no DNA do esqueleto, sua expressão acionada pelo promotor P-CaMV.35Sen.
25

Um constructo de DNA ilustrado na figura 6 (pMON69869) contém os elementos genéticos para expressão do marcador selecionável *aroA*:CP4 que provê resistência a glifosato, e no DNA do esqueleto do vetor, um transgene marcador selecionável negativo não-letal, o polinucleotídeo
30 codificando a enzima IPT de *Agrobacterium tumefaciens* (ipt ou AGRtu.ipt, SEQ ID NO: 2). Um constructo de DNA ilustrado na figura 7 (pMON75157) mostra um plasmídeo que contém elementos genéticos adicionais utilizáveis

47

para expressão da sequência de codificação AGRtu.*ipt*. Este cassete de expressão pode ser usado no esqueleto do vetor de plasmídeos de DNA usados para a transformação mediada por *Agrobacterium* de células de planta.

5 Um constructo de DNA ilustrado na figura 8 (pMON75182) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador classificável (GUS) e um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*nptII*). A sequência de codificação AGRtu.*ipt* está contida no DNA do esqueleto do vetor. O gene marcador classificável pode ser substituído com transgenes de
10 interesse agronômico (GOI) para prover traços agronômicos valiosos pra as plantas de cultura.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 9 (pLAGILB01.0035) contém, no T-DNA, o transgene para um transgene melhorador de rendimento (P-Seed/I-Zm.DnaK-Hsp70/Cglut.CordapA/T-AGRtu.Tr7) e um
15 transgene marcador selecionável de glifosato. O cassete de expressão *ipt* (P-CaMV.35S:en/I-Zm.DNAK/*ipt*/T-AGRtu.nos3') está contido no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 10 (pLAGILB01.0038) contém dois transgenes de resistência a insetos, os polinucleotídeos que
20 codificam uma proteína Bt.EG11768 e uma proteína Bt.cryIIAb. O gene AGRtu.*ipt* está no DNA do esqueleto, a expressão acionada pelo promotor P-CaMV.35Sen.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 11 (pMON75183) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador classificável (GUS) e um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*nptII*). A sequência de codificação *codA* está contida no DNA do esqueleto do vetor. O *codA* provê um marcador selecionável letal condicional. Durante a regeneração da célula de planta, o tecido de calo é transferido para meios contendo 5-fluorocitosina, células de plantas que expressam citosina deaminase serão
25 mortas, deixando somente células de plantas que não contém o DNA do esqueleto do vetor. O gene marcador classificável pode ser substituído com transgenes de interesse agronômico (GOI) para prover traços agronômicos
30

48

valiosos para as plantas de cultura.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 12 (pMON75181) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador classificável (GUS) e um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*nptII*). O T-DNA contém os mesmos cassetes de expressão como pMON75183. O gene marcador selecionável negativo não-letal *crtB* está localizado no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 13 (pMON42066) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador classificável (GUS) e um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*nptII*). O T-DNA contém os mesmos cassetes de expressão como pMON75183 e pMON75181. Não se tem marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta (sem gene) no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 16 (pMON73564) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um promotor e um gene de interesse. Não se tem marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta (sem gene) no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 17 (pMON73565) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um promotor e gene de interesse. O gene marcador selecionável negativo não-letal *crtB* está localizado no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 20 (pMON67935) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um promotor e gene de interesse. Não se tem marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta (sem gene) no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 21 (pMON67936) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um

promotor e gene de interesse. O transgene marcador selecionável negativo não-letal *crtB* está localizado no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 24 (pMON83912) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um gene repórter GUS. Um cassete de expressão de célula de planta contendo o gene marcador selecionável negativo não-letal codificando uma gibberelina 2-oxidase de *Phaseolus coccineus* (SEQ ID NO: 3) está no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 25 (pMON83908) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um gene repórter GUS. Um cassete de expressão de célula de planta contendo o gene marcador selecionável negativo não-letal (CKX1, SEQ ID NO: 4) codificando uma citocinina oxidase está no DNA do esqueleto do vetor.

Um constructo de DNA ilustrado na figura 25 (pMON83907) contém, no T-DNA, os transgenes para um gene marcador selecionável positivo (AGRtu.*aroA*-CP4) e um cassete de expressão compreendendo um gene repórter GUS. Um cassete de expressão de célula de planta contendo o gene marcador selecionável negativo não-letal (*sacB*, SEQ ID NO: 5) codificando um levansucrase está no DNA do esqueleto do vetor.

Os constructos de DNA podem ser construídas em um modo similar como o descrito acima que compreende outros genes de interferência metabólica no esqueleto do vetor. Exemplos destes incluem, mas não são limitados aos polinucleotídeos que codificam para levedura invertase (SEQ ID NO: 6) e levedura trehalose-6-fosfato sintase (SEQ ID NO: 7).

EXEMPLO 2

Transformação de cultura

Os constructos de DNA descritos na presente invenção (por exemplo, pMON42066, pMON75181, pMON75182 e pMON75183) são transformados em uma cepa *Agrobacterium* desativada. O constructo de

DNA é transferido em *Agrobacterium*, por exemplo, por um método de união triparental (Ditta *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 7347 - 7351, 1980), ou por eletroporação. Culturas líquidas de *Agrobacterium* são iniciadas a partir das cargas de glicerol ou de uma placa recentemente riscada e cultivadas durante a noite a 26 °C - 28 °C com agitação (aproximadamente 150 rpm) para uma fase de crescimento semi-log em meio LB líquido, pH 7,0 contendo os antibióticos apropriados. As células de *Agrobacterium* são recolocadas em suspensão no meio de inoculação e a densidade é ajustada a OD₆₆₀ de cerca de 1.

Transformação de células de milho e regeneração das células em plantas férteis intactas por transformação mediada por *Agrobacterium* podem ser conduzidas usando vários métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, as sementes de milho esterilizadas na superfície são germinadas e as mudas cortadas em pedaços. Colocar cada pedaço de muda com a superfície ferida voltada para baixo em meio sólido MSW57 de indução de calo, 10 a 16 pedaços por placa de Petri, incubar as placas em um incubador Percival iluminado (16 h de fotoperíodo), 28 °C. Após 2 a 4 semanas, transferir os calos embriogênicos para meio MSW57 novo, incubar no escuro a 28 °C durante 2-3 semanas.

Selecionar os pedaços de calo que foram sub-cultivados 6 a 8 dias previamente, em uma placa de Petri (100 mm x 25 mm). Cada placa pode conter 300 - 500 pedaços de calos. Adicionar 1 µl de F-68 (10% de solução Pluronic F-68, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) por 1 ml de suspensão de célula *Agrobacterium* (*Agrobacterium* contendo um plasmídeo de DNA da presente invenção), então adicionar suficiente desta suspensão para cobrir o tecido. Incubar durante 5-20 min em temperatura ambiente. Remover a suspensão de *Agrobacterium* com uma pipeta de transferência de ponta fina. Descarregar os pedaços de calo em uma placa de Petri, com 3 pedaços de papel de filtro estéril (Whatman Nº 1, 8, 5 ou 9 cm de diâmetro) no fundo e 2 pedaços de papel de filtro no topo. Secar os mesmos brevemente no mata-borrão com o lado superior voltado para baixo algumas vezes. Transferir os pedaços de calo (60-100 cada) em uma placa de Petri

com um 1 pedaço de papel de filtro sem água ou meio e vedar o disco com parafina. Incubar a placa no escuro a 23 °C durante 2-3 dias.

- Preparar as placas de cultura por colocação de 2 pedaços de feltro (quadrados de 2 cm x 2 cm) em cada placa de Petri com 23-25 ml do meio MSW57/C500/P100 (carbenicilina 500 mg/L, paromomicina 100 mg/L), ver tabela 1 para componentes dos meios. Transferir os pedaços de calo em placas de cultura. Durante a transferência, separar os calos em pedaços pequenos (2-3 mm) cada placa de cultura pode conter 16-25 pedaços de calo. Incubar as placas de cultura no escuro a 27 °C durante aproximadamente 2 semanas. Remover o meio de seleção, então adicionar 18 - 20 ml de meio novo. Incubar as placas no escuro a 27 °C durante aproximadamente 2 semanas. Remover o meio de seleção e substituir com 18-20 ml de meio MS/6BA/C250/P100 (tecido transformado com plasmídeos de DNA que incluíram o gene *codA* foi transferido para meio que continha de 25 mg/L a 1000 mg/l 5-fluorocitosina). Movimentar as placas para um incubador iluminado (16 h luz, 27 °C) durante 5-7 dias, então movimentar os tecidos em crescimento para meio sólido MSOD/C250/P100. Incubar aproximadamente 2 semanas neste meio. As peças de calo terão regenerado brotos verdes com ou sem raízes. Estes brotos devem ter aparência saudável e serem facilmente distinguíveis de alguns brotos pequenos. Transferir os brotos saudáveis sobre MSOD/C250/P100 solidificado com 3 g/l de Phytagar. Durante a transferência, remover o tecido de calo fixado à área de raiz dos brotos, incubar para aumentar os brotos e raízes, então transferir para o solo.

25 Tabela 1. Componentes do meio

MSW57

Quantidade / L	Ingredientes pré-autoclavagem
4,4 g	Gibco MS (500 - 1117EH)
10 ml	Vitaminas MS 100X (Sigma M-7150)
1,25 ml	Tiamina HCl (0,4 mg/ml)
30 g	Sacarose (Sigma S-5391)
1,38 g	1-Prolina (Sigma P-4655)
0,5 g	Ácidos casamino (DifCo DR0288-01-2)

P 10409239

12/11

3,0 g	Phytigel (Sigma P-8169)
Ingredientes pós-autoclavagem	
0,5 ml	2,4-D (1 mg/ml)
2.2 ml	Picloram (1 mg/ml)
1,7 ml	Nitrato de prata (2 mg/ml)

MS0D/C250/P100

Quantidade / L	Ingredientes pré-autoclavagem
4,4 g	Gibco MS (500 - 1117EH)
1 ml	MS Fromm 1000X
10 g	Glicose (PhytaTech G386)
20 g	Maltose (PhytaTech M588)
0,15 g	1-Asparagina (Sigma A-4284)
0,01 g	Mio-inositol (Sigma I-3011)
6,0 g	Phytagar (10675-031)
Ingredientes pós-autoclavagem	
2 ml	Paromomicina (50 mg/ml)
1 ml	Carbenicilina (250 mg/ml)

MS/6BA/P100/C250

Quantidade / L	Ingredientes pré-autoclavagem
4,4 g	Gibco MS (500 - 1117EH)
10 ml	Vitaminas MS 100X (Sigma M-7150)
1,25 ml	Tiamina HCl (0,4 mg/ml)
7,04 ml	BAP (0,5 mg/ml)
30 g	Sacarose (Sigma S-5391)
1,38 g	1-Prolina (Sigma P-4655)
0,5 g	Ácidos casamino (DifCo DF0288-01-2)
Ingredientes pós-autoclavagem	
2 ml	Paromomicina (50 mg/ml)
1 ml	Carbenicilina (250 mg/ml)

- 5 As células de plantas dicotiledôneas podem ser transformadas e regeneradas em plantas intactas por métodos conhecidos na técnica de transformação de plantas e cultura de tecido. O uso de métodos mediados por *Agrobacterium* para transferir o T-DNA dos plasmídeos da presente invenção é bem conhecido na técnica. Por exemplo, algodão (patente U.S. número 5.004.863; patente U.S. número 5.159.135; patente U.S. número

5.518.908, incorporada aqui por referência), soja (patente U.S. número 5.569.834; patente U.S. número 5.416.011, incorporada aqui por referência).

Os métodos de transformação e regeneração acima fornecem plantas que são muito reduzidas na ocorrência de DNA do esqueleto do vetor. Adicionalmente, as plantas tem um benefício adicional de ter um número de cópias reduzido do T-DNA de inserto. As plantas produzidas pelo método são um aspecto da invenção.

EXEMPLO 3

Análise molecular para DNA do esqueleto do vetor e número de cópia.

10 DNA é extraído das amostras de tecido removidas das plantas transformadas com os plasmídeos de DNA da presente invenção e regeneradas de cultura de tecido de células de plantas. Um método com base em PCR é usado para testar o DNA pela presença de segmento de DNA Ec.ori, um indicador do esqueleto do vetor. Este DNA é adjacente ao

15 LB e sua presença no DNA extraído das plantas regeneradas indica que a transferência das seqüências de vetor além do LB ocorreu. DNA pode ser isolado dos tecidos de plantas por qualquer número de métodos, por exemplo, o procedimento CTAB (Rogers *et al.*, Plant Mol. Biol. 5: 69 - 76, 1985) ou DNAeasy® 96 Plant Kit (Cat. nº 69181, Qiagen Inc., Valencia, CA)

20 de acordo com as instruções dos fabricantes. Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) é descrito como um método para detectar e quantificar a presença de uma seqüência de DNA e é completamente entendido nas instruções dos fabricantes. As moléculas de iniciador de DNA listadas na tabela 2 são usadas no método descrito para identificar o DNA

25 Ec.oriV dos extratos de plantas. As condições e aparelhos usados podem ser modificados pelos versados na técnica para alcançar os mesmos resultados.

As células de plantas de milho foram transformadas com um plasmídeo de DNA de controle (pMON42066), um plasmídeo de DNA com um gene letal condicional no esqueleto do vetor (pMON75183), um

30 plasmídeo de DNA com um gene marcador selecionável não-letal (*ipt*, pMON75182), e um plasmídeo de DNA com um gene marcador



selecionável não-letal (*crtB*, pMON75181), então regenerados em plantas intactas. As plantas intactas foram analisadas pela presença de *Ec.oriV*. A figura 14 mostra os resultados desta análise. Aproximadamente metade das trinta e cinco plantas que foram regeneradas após transformação com o plasmídeo de controle (sem gene, pMON42066) são positivas para *Ec.oriV* DNA, e aproximadamente trinta e cinco por cento dentre as setenta e sete plantas transformadas com o plasmídeo de gene letal condicional (*codA*, pMON75183). Surpreendentemente, os genes marcadores selecionáveis negativos não-letais, *ipt* e *crtB*, fornecem uma redução excepcional na ocorrência de plantas transgênicas com *Ec.ori V* DNA. Somente cinco por cento das oitenta e três plantas transformadas com pMON75182 continham o *Ec.oriV* DNA, e somente oito por cento das sessenta e uma plantas transformadas com pMON75181.

Estes resultados demonstram que um benefício substancial conferido pelos plasmídeos de DNA da presente invenção por redução da ocorrência do esqueleto do vetor. Quase metade das plantas transformadas com a configuração de plasmídeo de DNA convencional (pMON42066) serão descartadas. Dentre as plantas transformadas com os plasmídeos de DNA (pMON75182, pMON75181) da presente invenção, menos de dez por cento devem ser descartados.

Tabela 2 – Teste Tagman® de ponto final de *Ec.oriV* – reação de 10 μ L

Elemento	Iniciador/ sonda conc. final	Conc. carga trabalho	Volu- me	Multipli- cador	Volume mistura mestre
Mistura mestre universal			5	70	350
H ₂ O			1,8	70	126
OriV-F SEQ ID NO: 8	0,4 μ M	20 μ M	0,2	70	14
OriV-R SEQ ID NO: 9	0,4 μ M	20 μ M	0,2	70	14
LGI-F SEQ ID NO: 11	0,4 μ M	20 μ M	0,2	70	14
LGI-R SEQ ID NO: 12	0,4 μ M	20 μ M	0,2	70	14
sonda OriV-FAM MGB SEQ ID NO: 10	0,1 μ M	5 μ M	0,2	70	14
sonda LGI VIC	0,1 μ M	5 μ M	0,2	70	14

P10409039

Elemento	Iniciador/ sonda conc. final	Conc. carga trabalho	Volu- me	Multipli- cador	Volume mistura mestre
----------	------------------------------------	----------------------------	-------------	--------------------	-----------------------------

SEQ ID NO: 13

amostra de DNA

2

reação 10 uL

Condições: motor MJ

50C	2:00	1 ciclo
95C	10:00	1 ciclo
95C	0:15	1 ciclo
56C	1:00	35 ciclos

Outro componente importante de uma planta transgênica comercialmente viável é a ocorrência de complexidade de inserto baixa. Isto é com frequência referido como um número de cópia baixo. É difícil

5 selecionar a progênie e procriar com sucesso o traço transgênico se o número de cópias do inserto for muito elevado. Idealmente, somente uma cópia única do transgene deve estar presente em um evento transgênico. O número de cópias pode ser determinado por vários métodos bem conhecidos na técnica de biologia molecular. A análise de imunopressão

10 Southern blot é o método mais comumente usado. Os métodos usando a tecnologia Taqman[®] também são precisos e confiáveis para a determinação do número de cópias de insertos de T-DNA em plantas transgênicas. O método e moléculas de iniciador de DNA descritos na tabela 3 mostram como testar plantas pela presença da seqüência de

15 codificação nptII. O cassete de expressão contendo o gene marcador selecionável de nptII está presente em pMON42066, pMON75183, e pMON75182. As plantas transformadas com estes plasmídeos de DNA são testadas por um método Taqman[®] para número de cópias e os resultados são mostrados na figura 15. A falta de gene no plasmídeo de estrutura

20 principal (pMON42066) mostra que o número de cópias médio das trinta e quatro plantas testadas é de cerca de dois e somente quarenta e sete por cento são de cópia única. O plasmídeo do marcador selecionável letal condicional (codA, pMON75183) mostra que o número de cópia médio das

cinquenta plantas testadas é de cerca de dois e somente trinta e seis por cento das plantas foram de cópia única. O plasmídeo do gene marcador selecionável negativo não-letal (*ipt*, pMON75182) mostra que o número de cópias médio de vinte e sete plantas testadas é de 1,2 e

5 surpreendentemente, oitenta e cinco por cento das plantas transgênicas foram de cópia única. Este resultado mostra o valor dos plasmídeos da presente invenção para reduzir o número de cópias de transgenes.

Tabela 3 : Teste Tagman® NPT II para ABI 7900 (formato de 384 cavidades)

Elemento	Iniciador/ sonda conc. final	Conc. Carga iniciador	Volu- me	Multi- plica- dor	Volume mistura mestre
Mistura mestre universal			5	500	2500
H2O			1,3	500	650
NPT II FP SEQ ID NO: 14	0,3 uM	10 uM	0,3	500	150
NPT II FP SEQ ID NO: 15	0,3 uM	10 uM	0,3	500	150
LGI F SEQ ID NO: 11	0,15 uM	10 uM	0,15	500	75
LGI R SEQ ID NO: 12	0,15 uM	10 uM	0,15	500	75
NPT II-FAM SEQ ID NO: 16	200 nM	5 uM	0,4	500	200
LGI -VIC SEQ ID NO: 13	200 nM	5 uM	0,4	500	200
amostra de DNA			2		

reação 10 uL

Condições: motor MJ

Temp	Tempo	Ciclo
50C	2:00	1 ciclo
95C	10:00	1 ciclo
95C	0:15	
56C	1:00	40 ciclos

10 Os constructos de DNA, pMON73564 e pMON73565, foram transformadas em células de milho, por exemplo, usando o método previamente descrito. As plantas de milho transgênicas resultantes foram testadas pela presença do DNA do esqueleto do vetor usando as condições previamente descritas para a detecção do Ec.ori DNA. Os resultados

15 ilustrados na figura 18 mostram que quase todas as plantas (N = 104)

regeneraram após transformação com pMON73565 (crtB+, gene marcador selecionável não-letal no esqueleto) estavam livres do Ec.oriV. Quarenta por cento das plantas (N = 115) transformadas com o constructo de controle, pMON73564 (crtB-, sem gene marcador no esqueleto), tinham o DNA Ec.oriV em seu genoma. O mesmo conjunto de plantas foi testado para número de cópias, os resultados ilustrados na figura 19. Estes resultados mostram que substancialmente mais plantas transformadas com pMON73565 (constructo crtB+) tinham um número de cópias baixo e estavam livres de estrutura principal comparado com plantas transformadas com constructo pMON73564 que não continham o gene marcador selecionável não-letal no esqueleto. Estes resultados demonstram a utilidade de um gene marcador selecionável não-letal no constructo de DNA para prover substancialmente mais plantas de qualidade comercial.

Evidência adicional é provida da utilidade do gene marcador selecionável não-letal no esqueleto do vetor dos dados coletados das células de milho transformadas com os constructos de DNA, pMON67935 e pMON67936, por exemplo, pelo método de transformação previamente descrito. As plantas de milho transgênicas resultantes foram testadas pela presença do DNA no esqueleto usando as condições previamente descritas para detecção do Ec.oriV DNA. Os resultados ilustrados na figura 22 mostram que mais do que 90 por cento das plantas (N = 54) regeneraram após transformação com pMON67936 (crtB+, gene marcador selecionável não-letal no esqueleto) estavam livres do Ec.oriV. Cerca de 40 por cento das plantas (N = 84) transformadas com o constructo de controle, pMON67935 (crtB-, sem gene marcador no esqueleto) tinham o DNA Ec.oriV em seu genoma. O mesmo conjunto de plantas foi testado para número de cópias, os resultados ilustrados na figura 23. Estes resultados mostram que substancialmente mais plantas transformadas com pMON67936 (crtB+ constructo) tinha um número de cópias baixo e foram livres de estrutura principal comparado com as plantas transformadas com o constructo pMON67935 que não continha o gene marcador selecionável não-letal no esqueleto. Estes resultados demonstram a utilidade de um gene

P 10409239



marcador selecionável não-letal no constructo de DNA para prover substancialmente mais plantas de qualidade comercial.

5 Tendo ilustrado e descrito os princípios da presente invenção, deve ser evidente para os versados na técnica que a invenção pode ser modificada na disposição e detalhes sem sair destes princípios. Os requerentes reivindicam todas as modificações que estão no espírito e escopo das reivindicações anexas.

10 Todas as publicações e documentos de patente publicados citados no relatório são incorporados aqui por referência na mesma extensão como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Plasmídeo de DNA, caracterizado pelo fato de que compreende um T-DNA compreendendo uma primeira região de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium* ligada a pelo menos um transgene ligado a uma segunda região de borda de plasmídeo Ti de *Agrobacterium*, e localizado no plasmídeo de DNA fora do T-DNA está um cassete de expressão de planta compreendendo um gene marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta ligado a um DNA do esqueleto do vetor, em que o referido gene marcador selecionável negativo não-letal é um gene fitoeno sintase.

2. Plasmídeo de DNA de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido cassete de expressão de planta compreende um promotor que funciona em células de plantas ligadas de modo operativo a um gene marcador selecionável negativo não-letal de célula de planta.

3. Plasmídeo de DNA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que referido promotor é um promotor constitutivo.

4. Plasmídeo de DNA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido promotor expressa o referido produto gênico marcador selecionável negativo não-letal ligado em cultura de tecido durante a regeneração da planta.

5. Plasmídeo de DNA de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido gene fitoeno sintase é um gene fitoeno sintase *Erwinia herbicola* (crtB).

6. Plasmídeo de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido transgene é um gene marcador selecionável positivo para planta selecionado do grupo consistindo em resistência a antibiótico e resistência a herbicida.

7. Plasmídeo de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido transgene compreende um transgene de interesse agrônômico.

8. Método para melhorar a seleção de plantas transgênicas que

não contém DNA do esqueleto do vetor, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- a) transformar uma pluralidade de células de plantas utilizando *Agrobacterium* com o plasmídeo de DNA, como definido na reivindicação 1, em que o transgene do plasmídeo compreende um gene marcador selecionável positivo; e
- b) selecionar as referidas células de plantas em um composto de seleção positivo; e
- c) regenerar as referidas células de plantas selecionadas em plantas.

9. Método para reduzir o número de cópias de um transgene em uma célula de planta, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- a) transformar uma pluralidade de células de plantas utilizando *Agrobacterium* com o plasmídeo de DNA, como definido na reivindicação 1, em que o transgene do plasmídeo compreende um gene marcador selecionável positivo; e
- b) selecionar as referidas células de plantas transformadas em um composto de seleção positivo; e
- c) regenerar referidas células de plantas selecionadas em plantas.

10409239

32

1/26

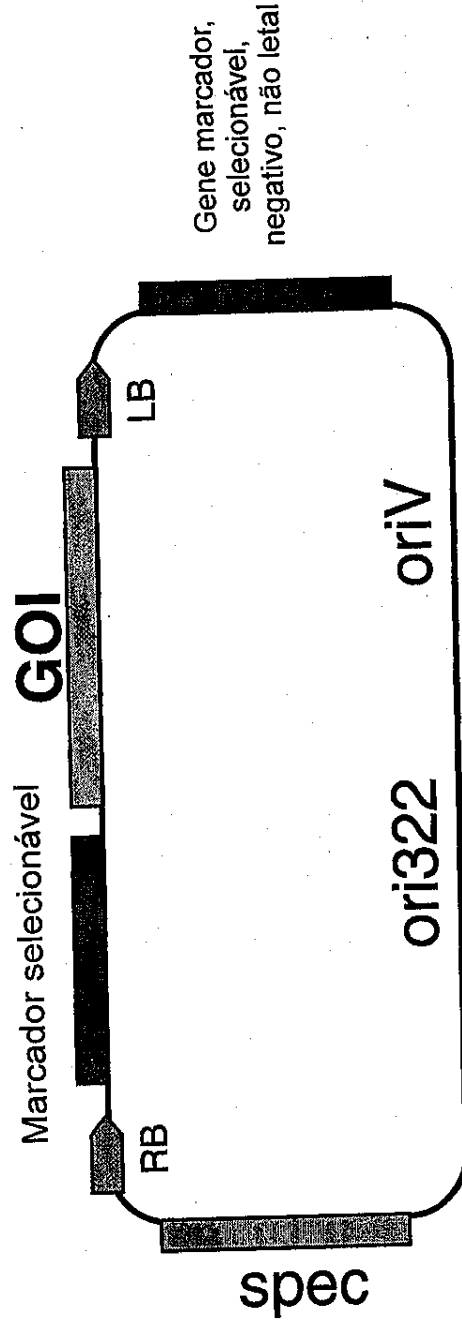


FIG. 1

Handwritten signature

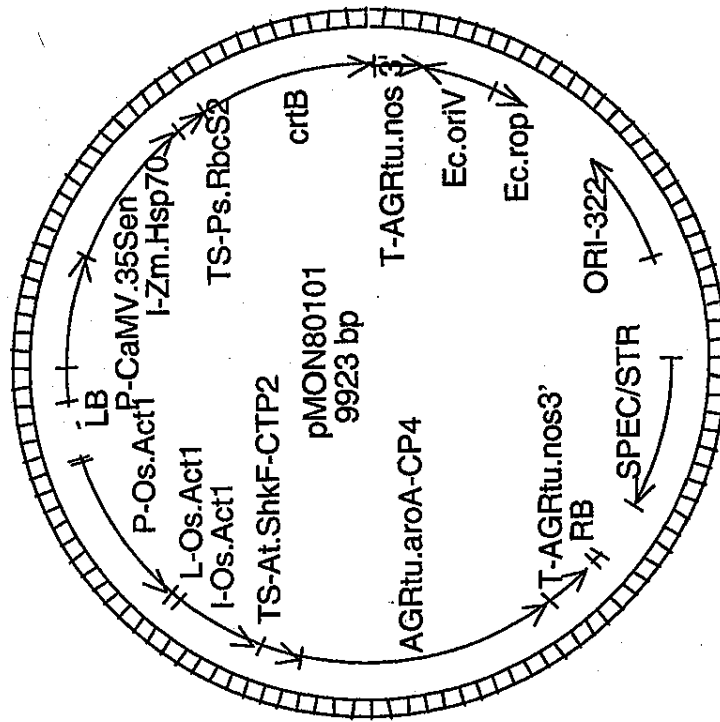


FIG. 2

P 10409239

72

3/26

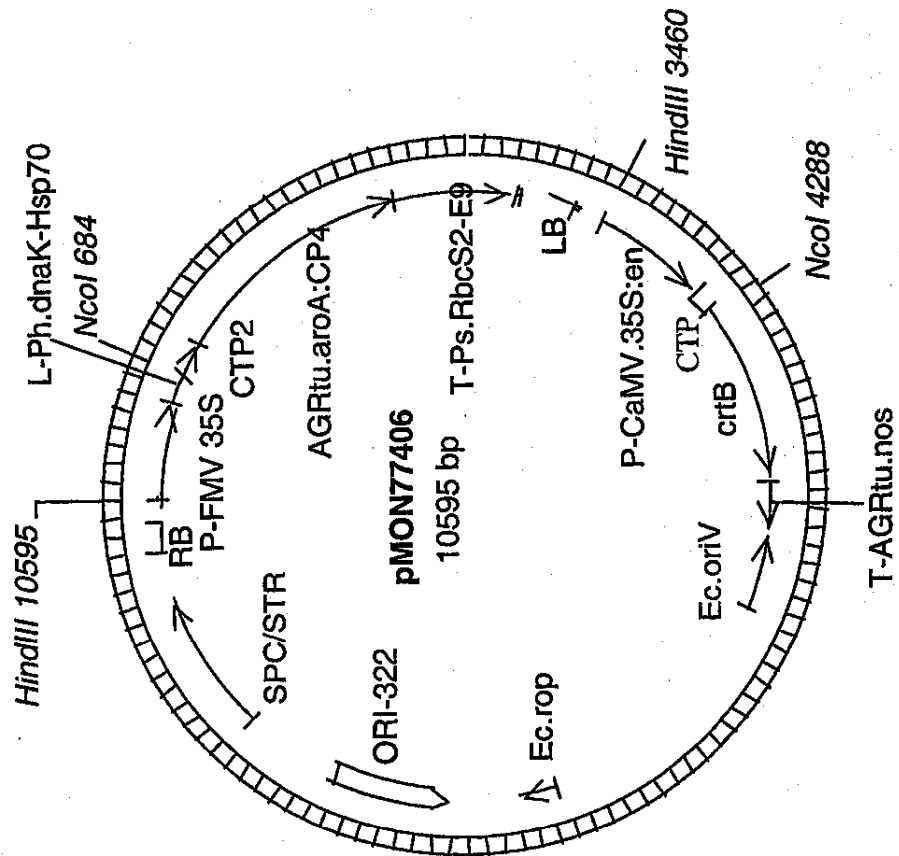


FIG. 3

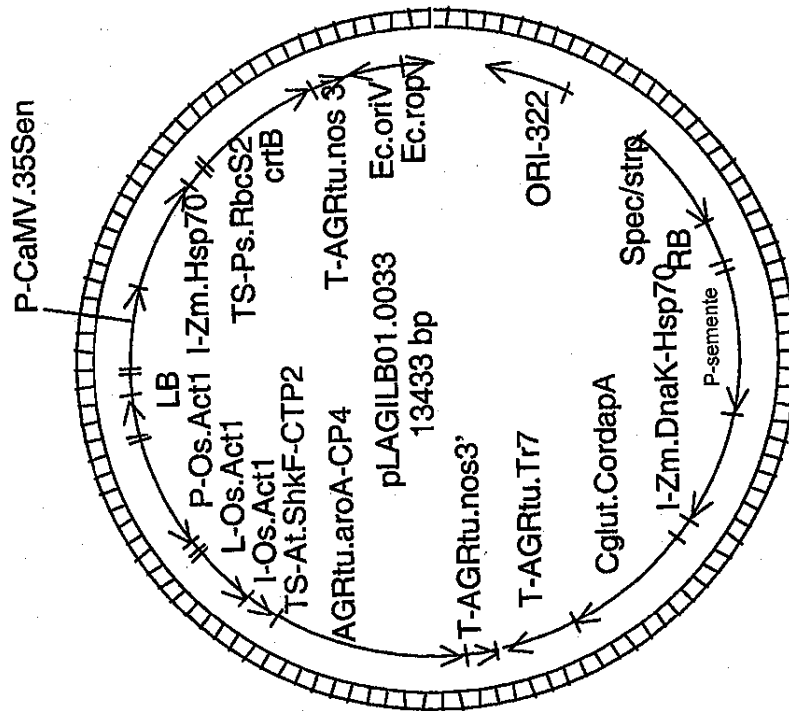


FIG. 4

P 10409239

BM

5/26

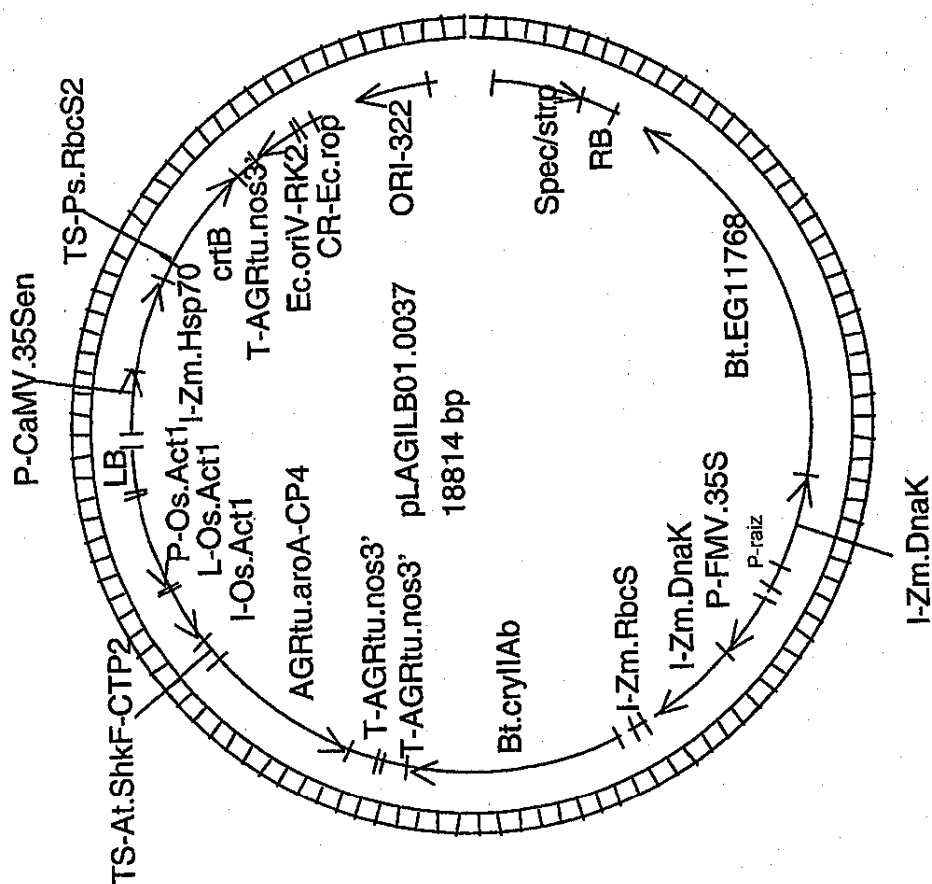


FIG. 5

Handwritten signature

6/26

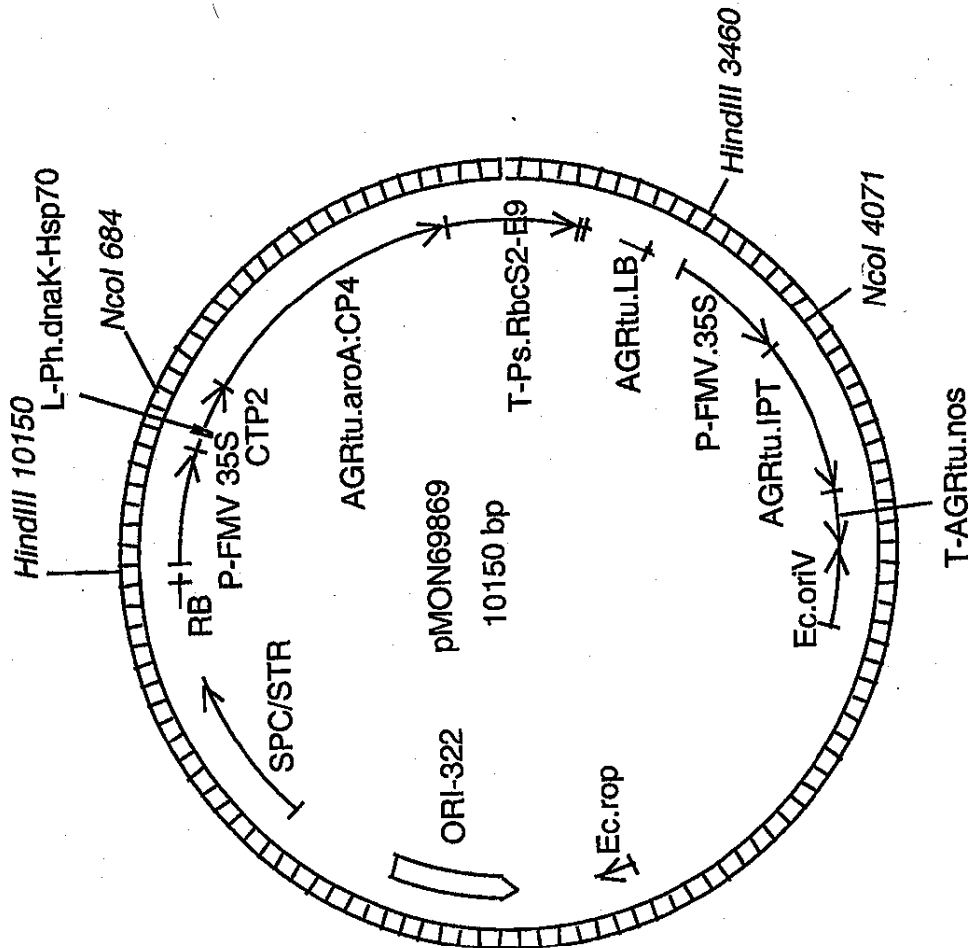


FIG. 6

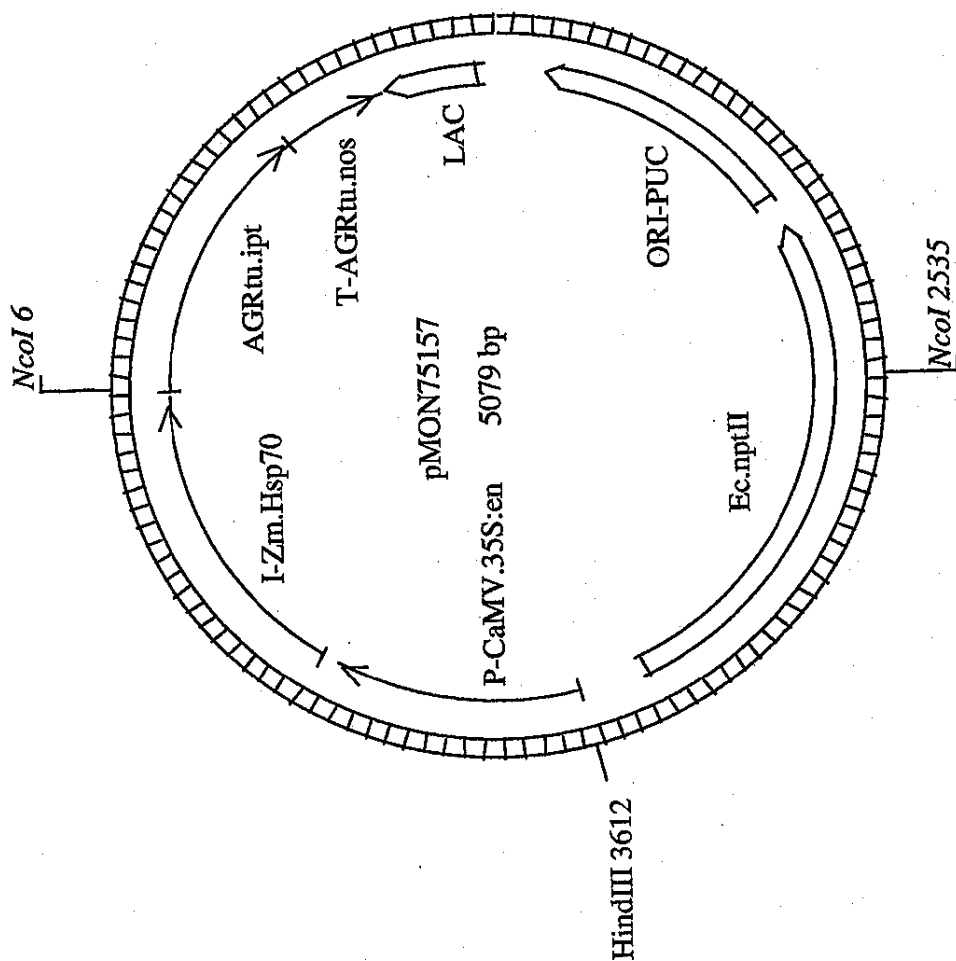


FIG. 7

8/26

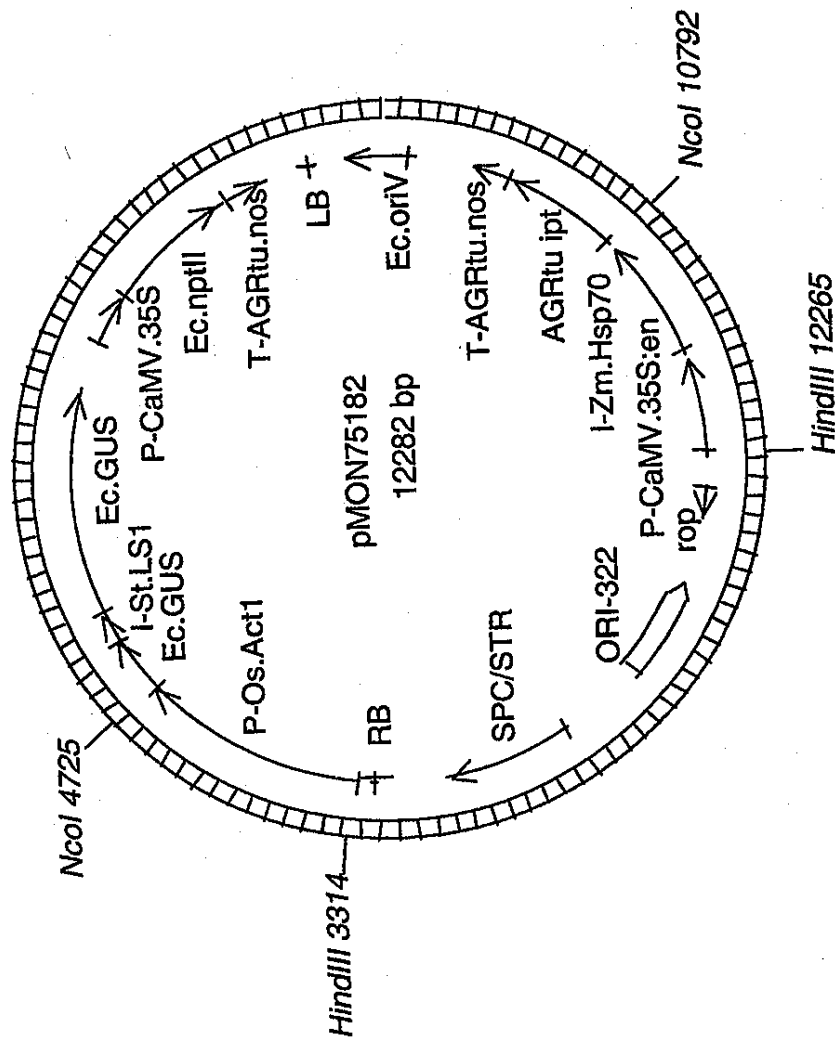


FIG. 8

9/26

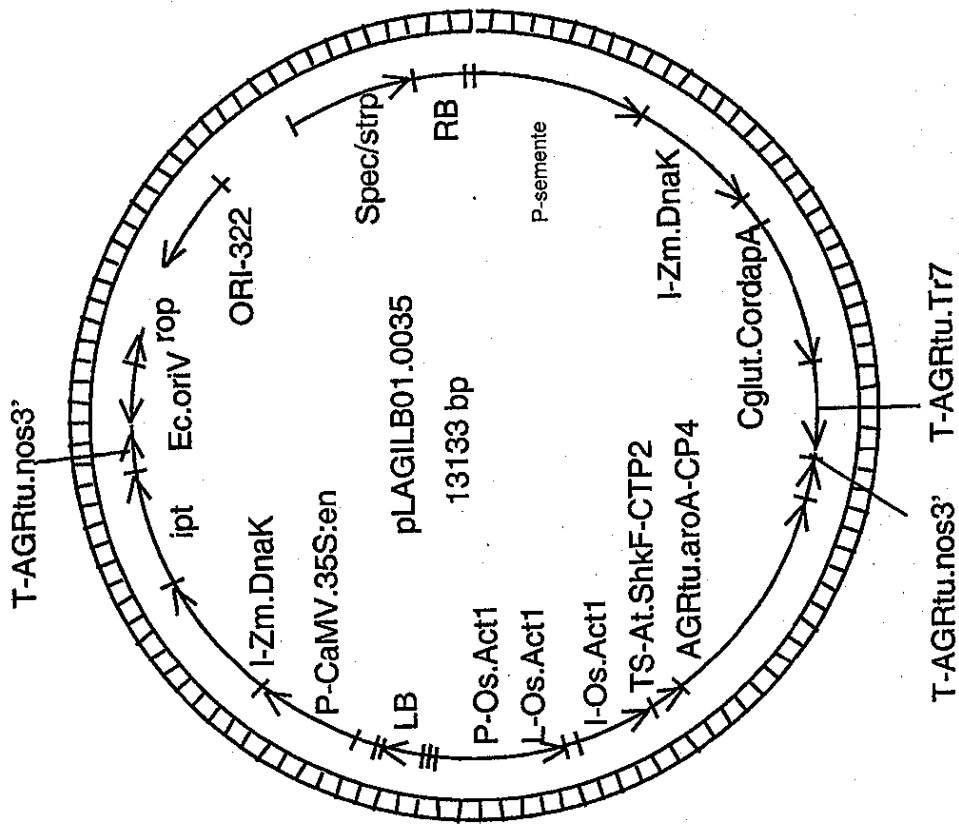


FIG. 9

P10409239

29

10/26

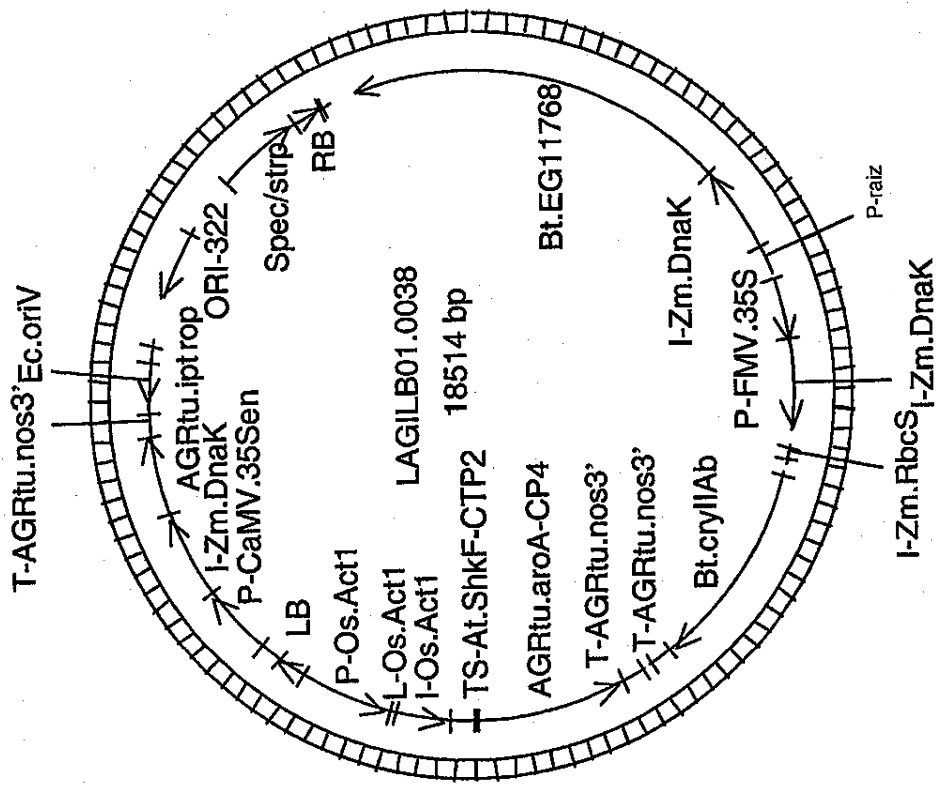


FIG. 10

11/26

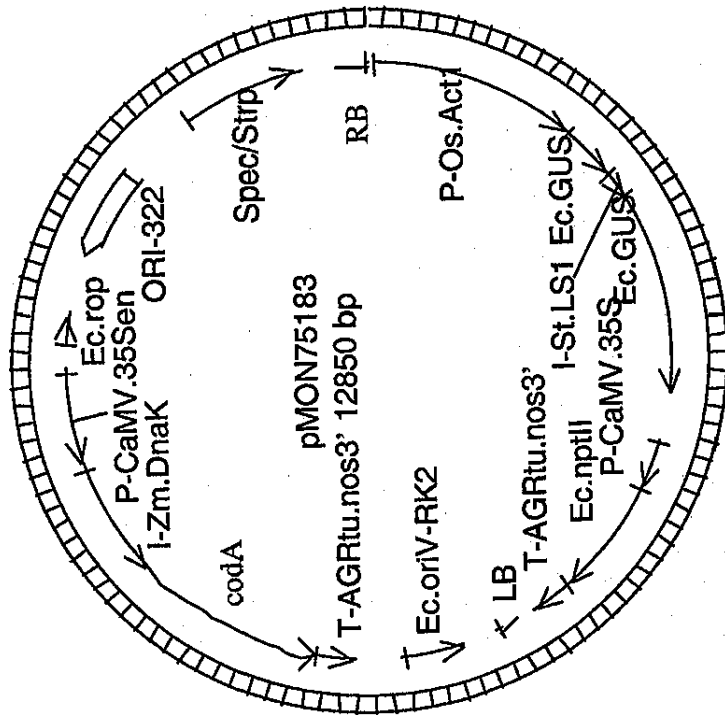


FIG. 11

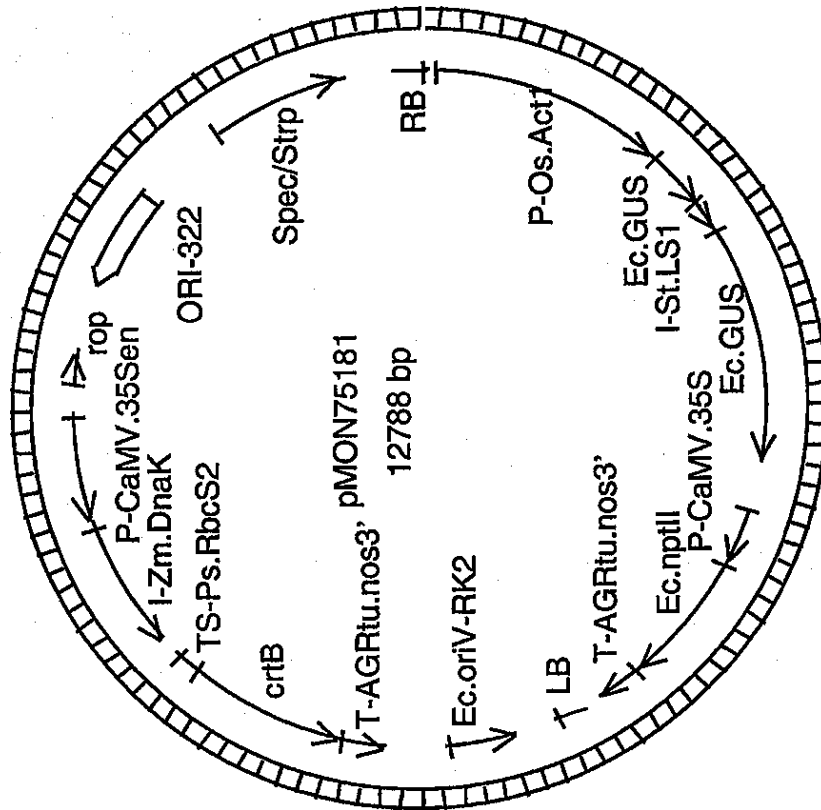


FIG. 12

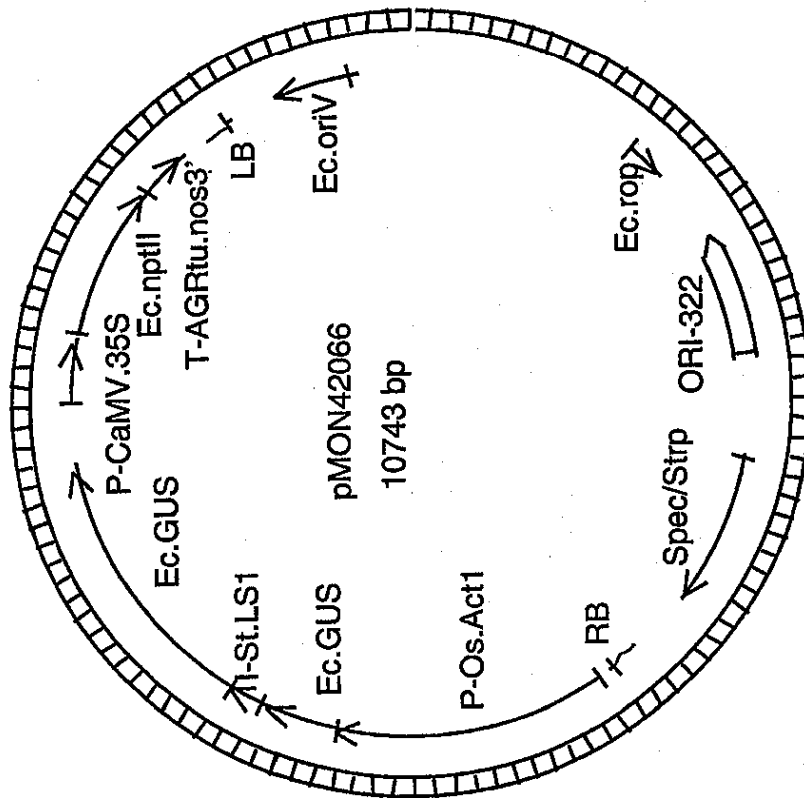


FIG. 13

P 1 0 4 0 9 2 3 9

83/2

14/26

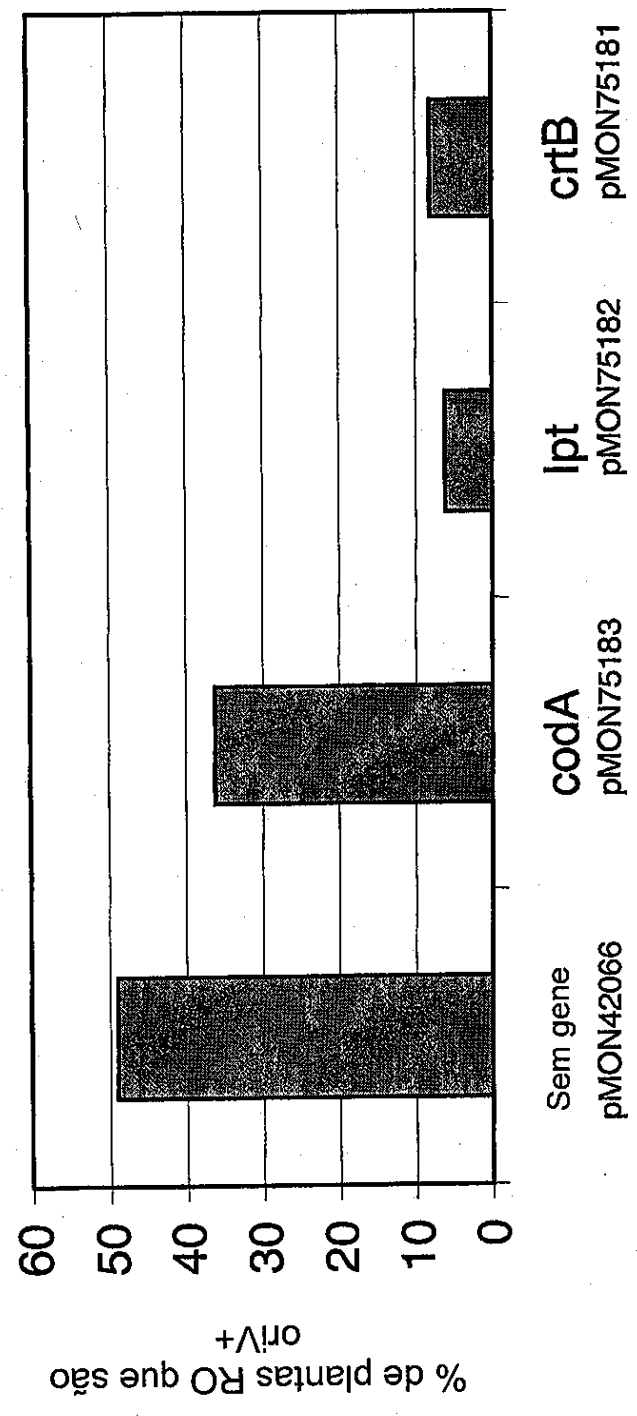


FIG. 14

8/18

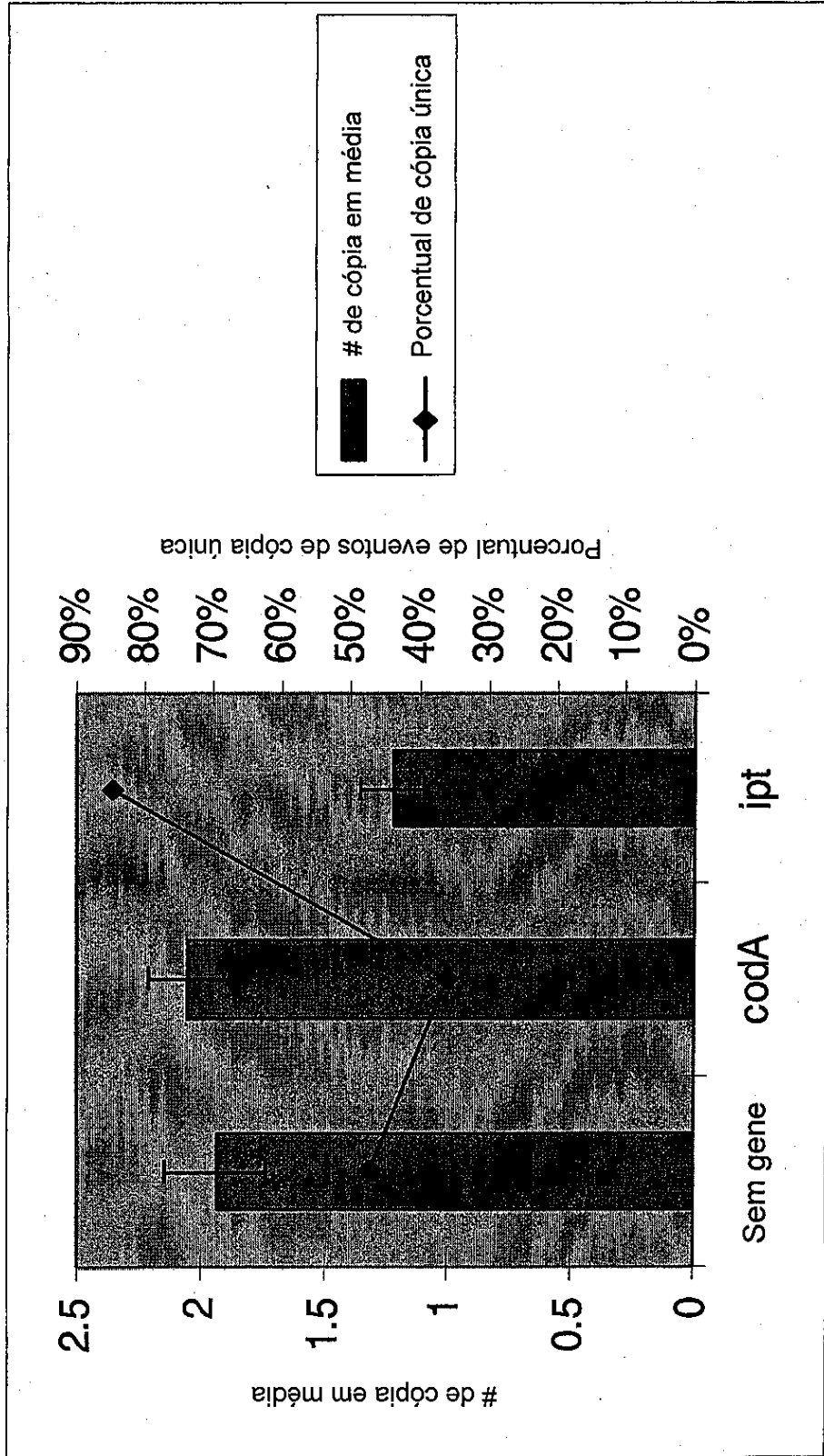


FIG. 15

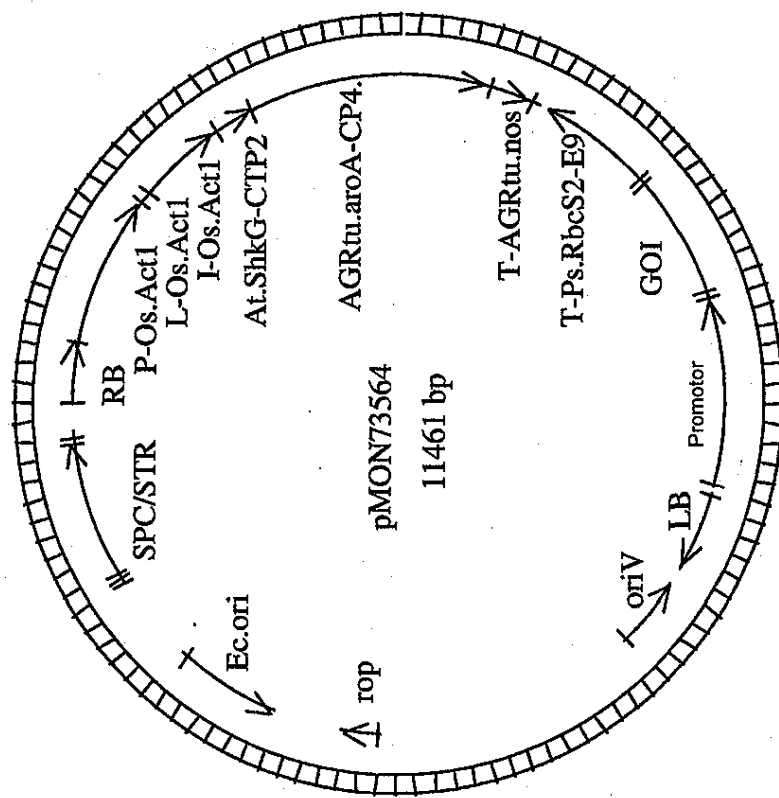


FIG. 16

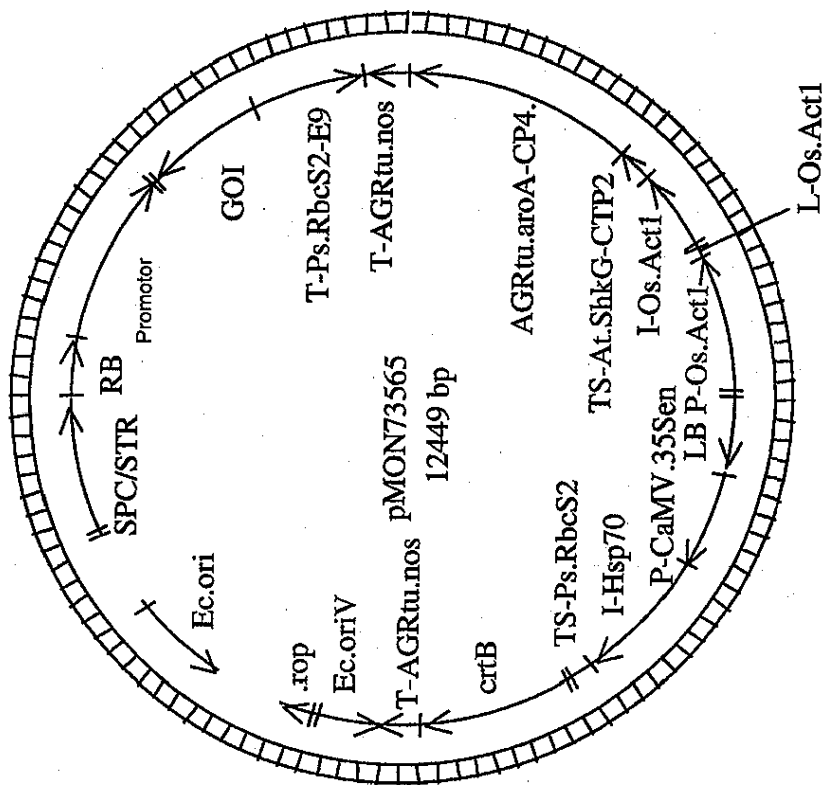
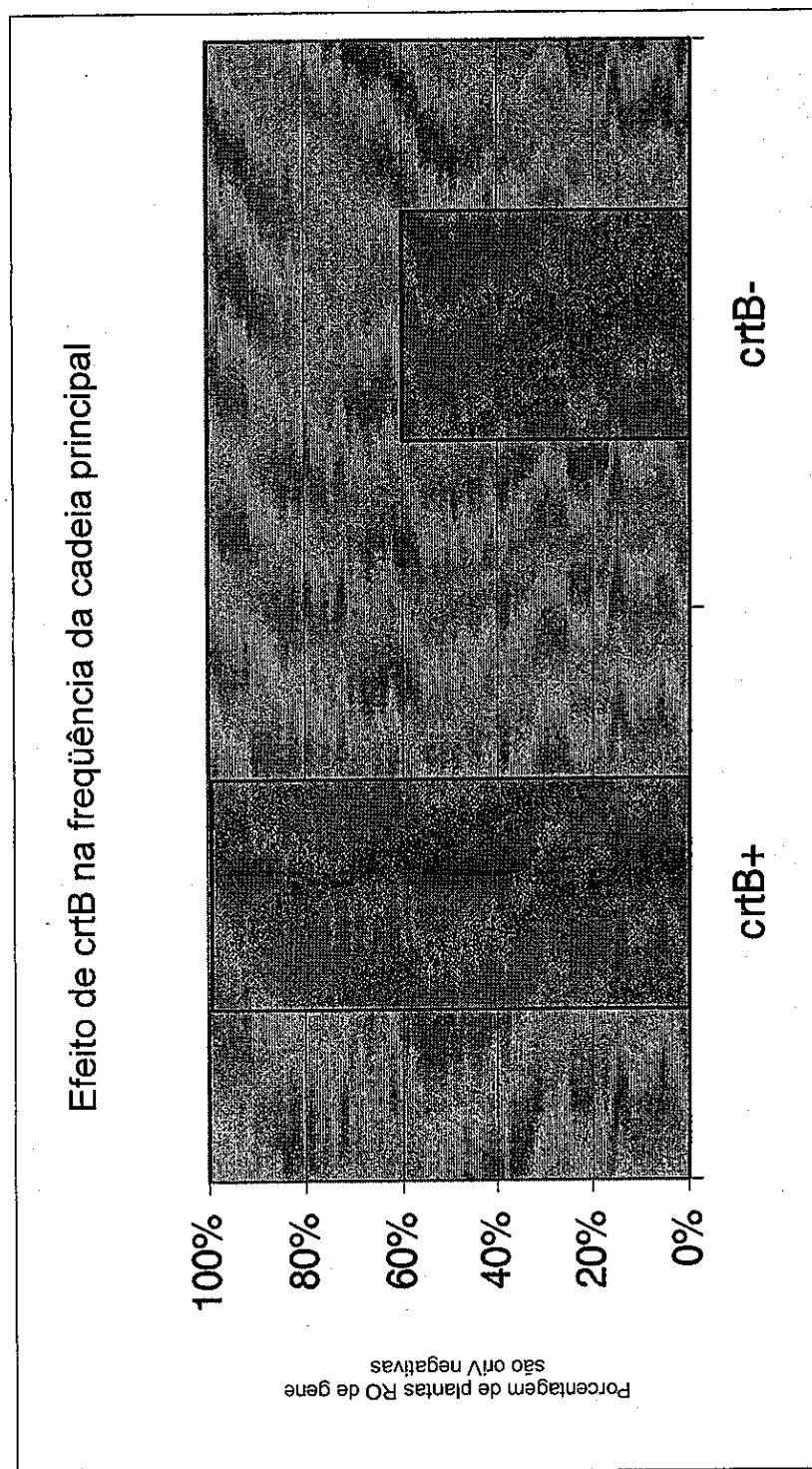


FIG. 19

Ocorrência da cadeia principal do vetor no genoma de plantas transgênicas

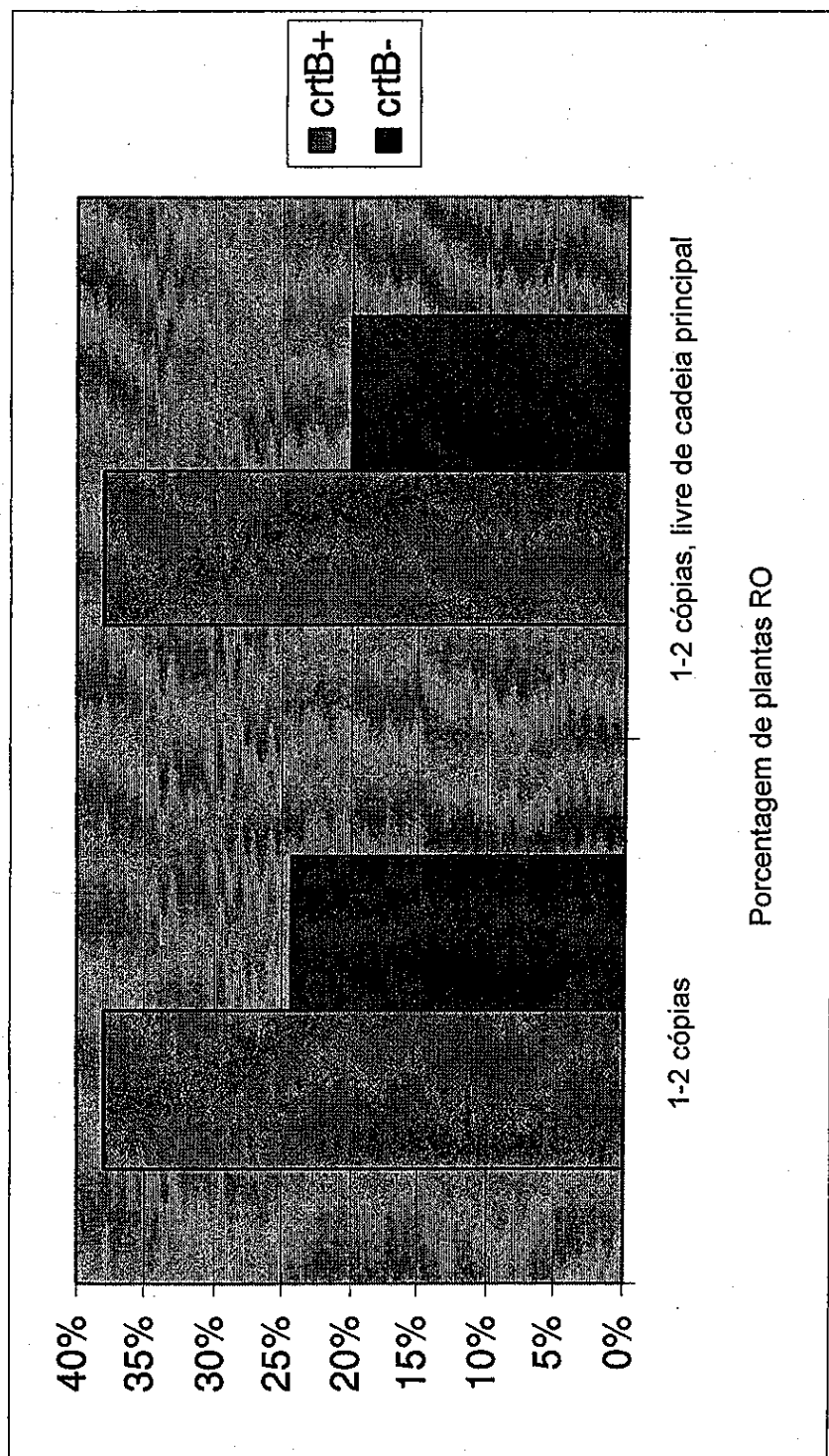


crtB- is pMON73564, N=115 plantas

crtB+ is pMON73565, N=104 plantas

FIG. 17

Ocorrência de inserções de cópia única em plantas transgênicas



crtB- is pMON73564, N=115 plantas

crtB+ is pMON73565, N=104 plantas

FIG. 18

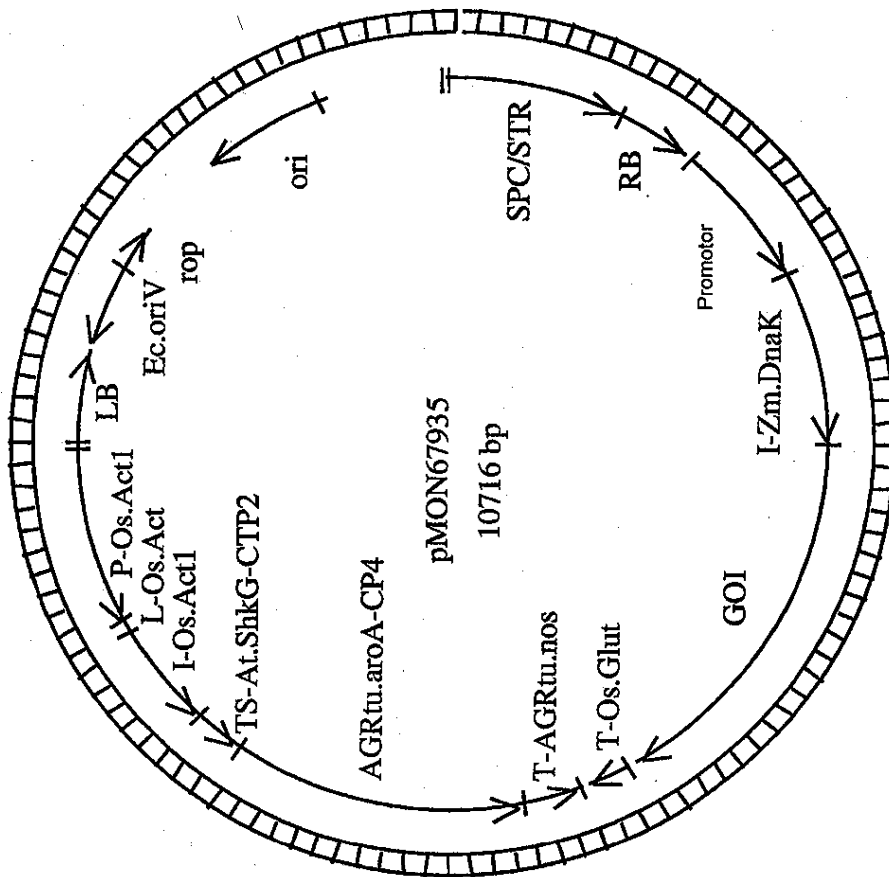


FIG. 20

89

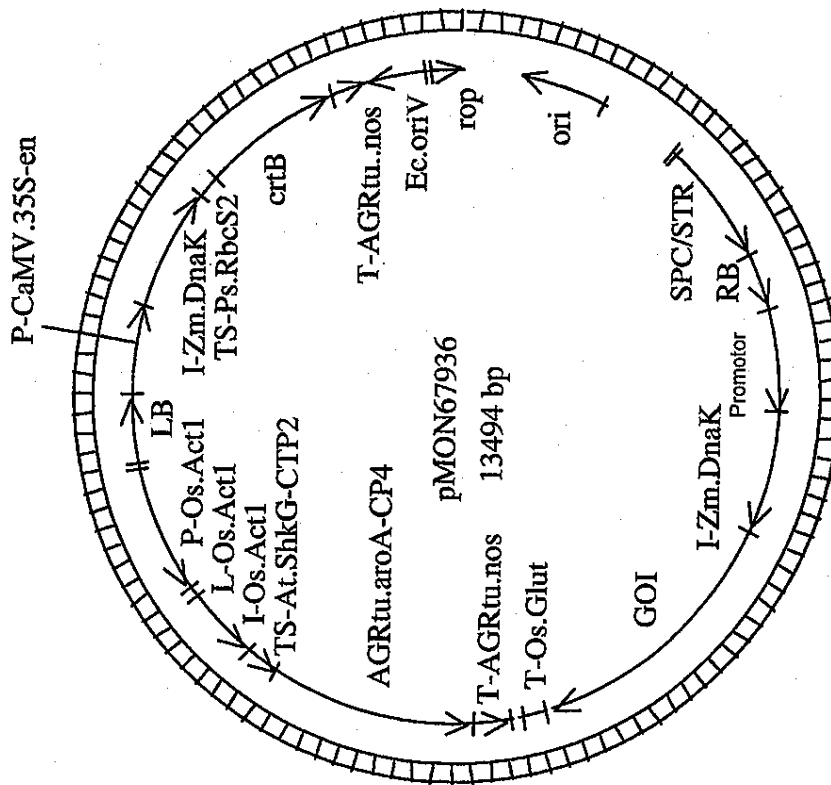
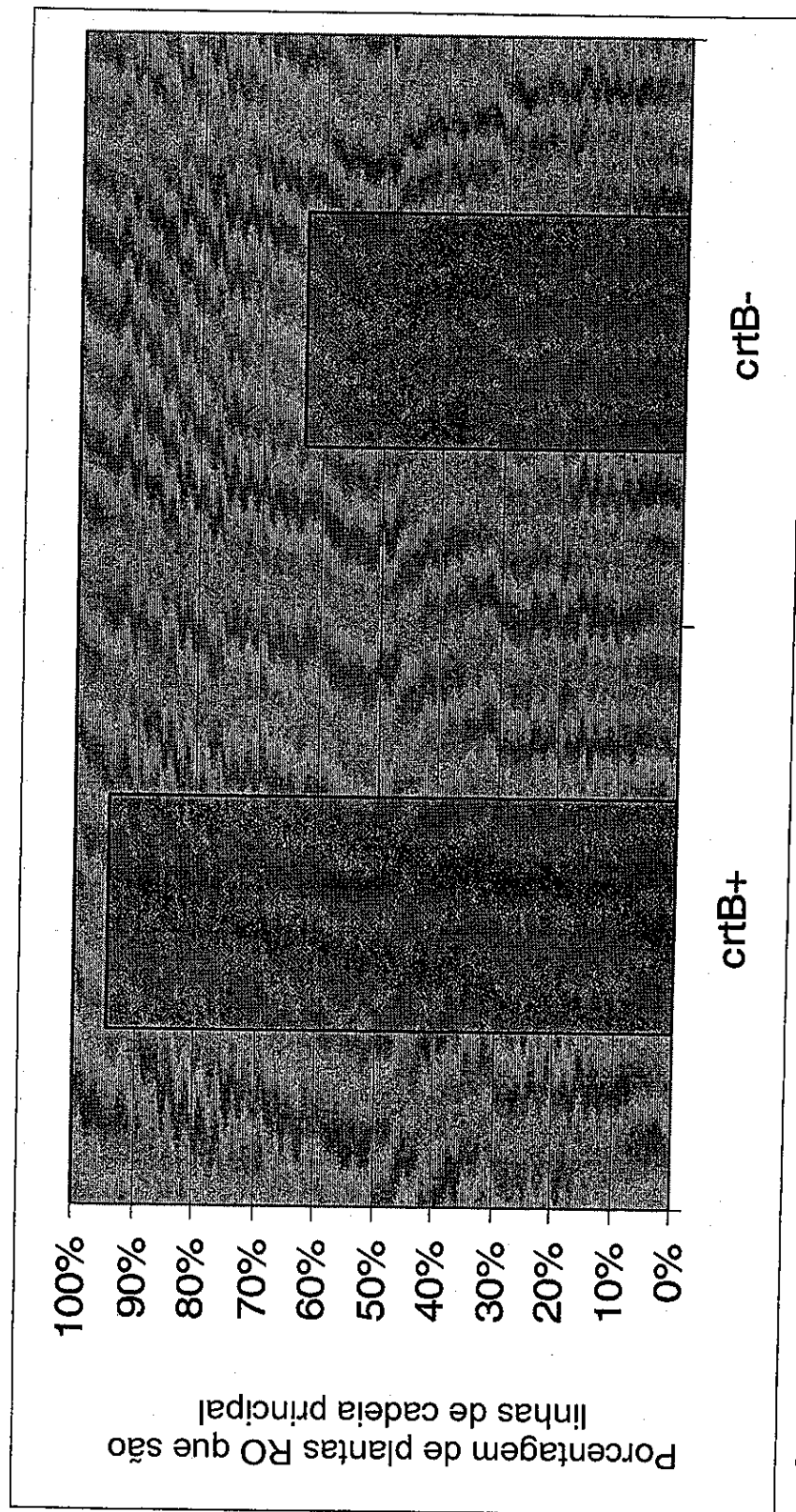


FIG. 21

Ocorrência de cadeia principal do vetor no genoma de plantas

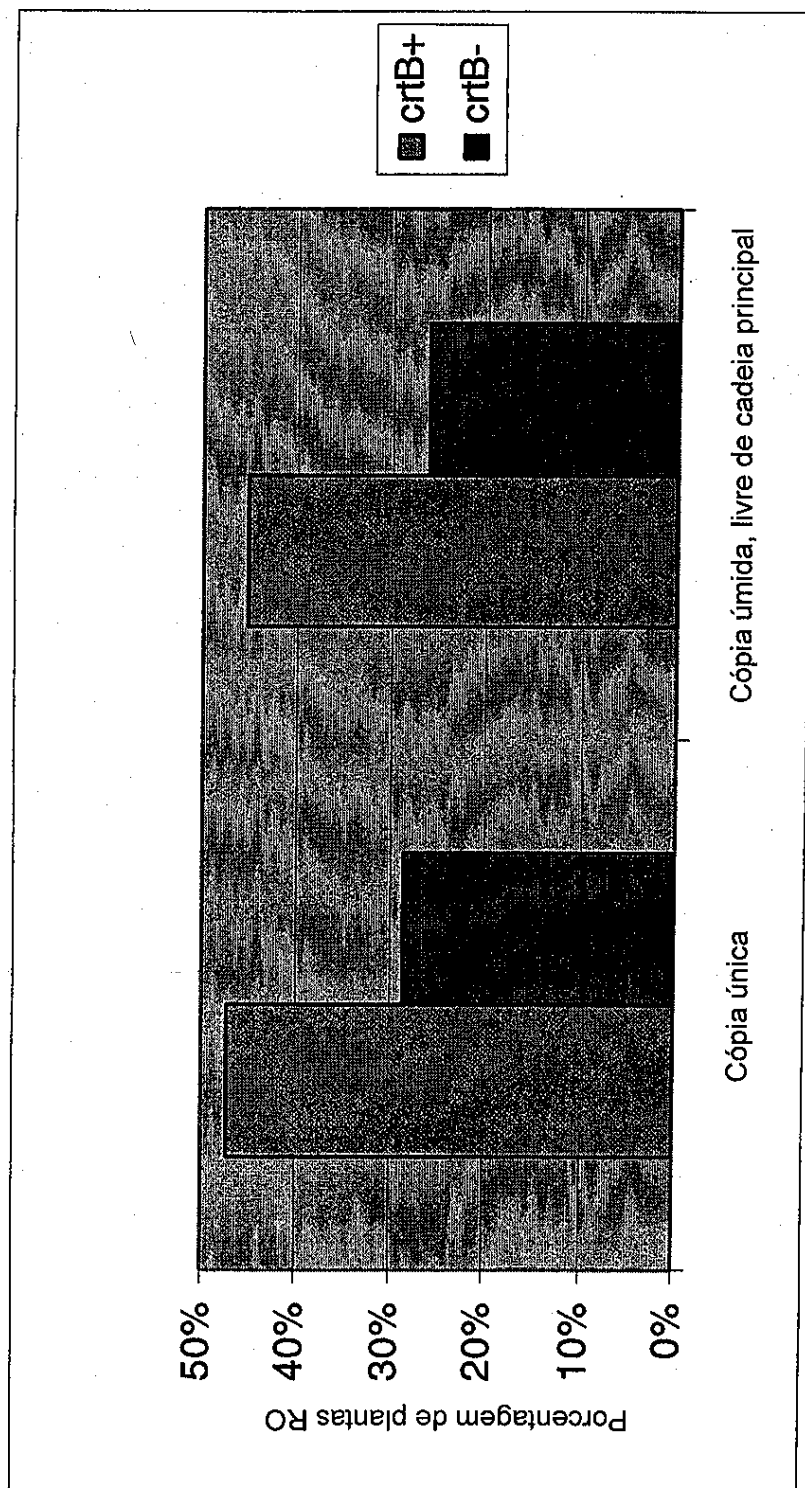


crtB- is pMON67935, N=84 plantas

crtB+ is pMON67936, N=54 plantas

FIG. 22

Ocorrência de inserções de cópia única no genoma de plantas transgênicas



crtB- is pMON67935, N=84 plantas
crtB+ is pMON67936, N=54 plantas

FIG. 23

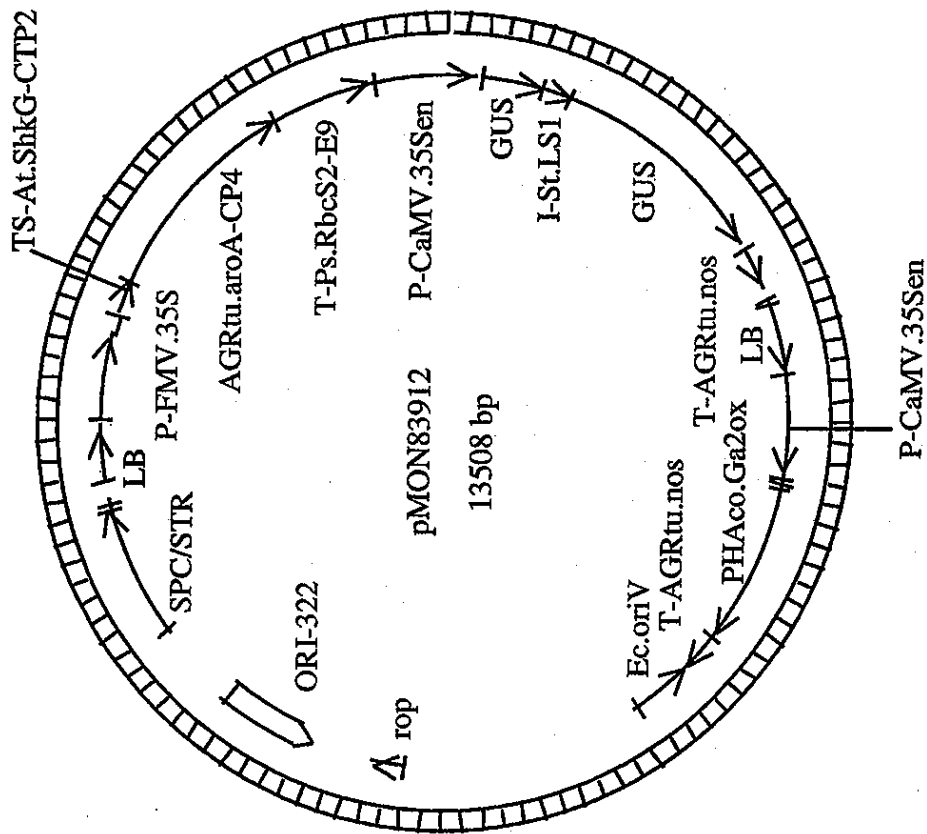


FIG. 24

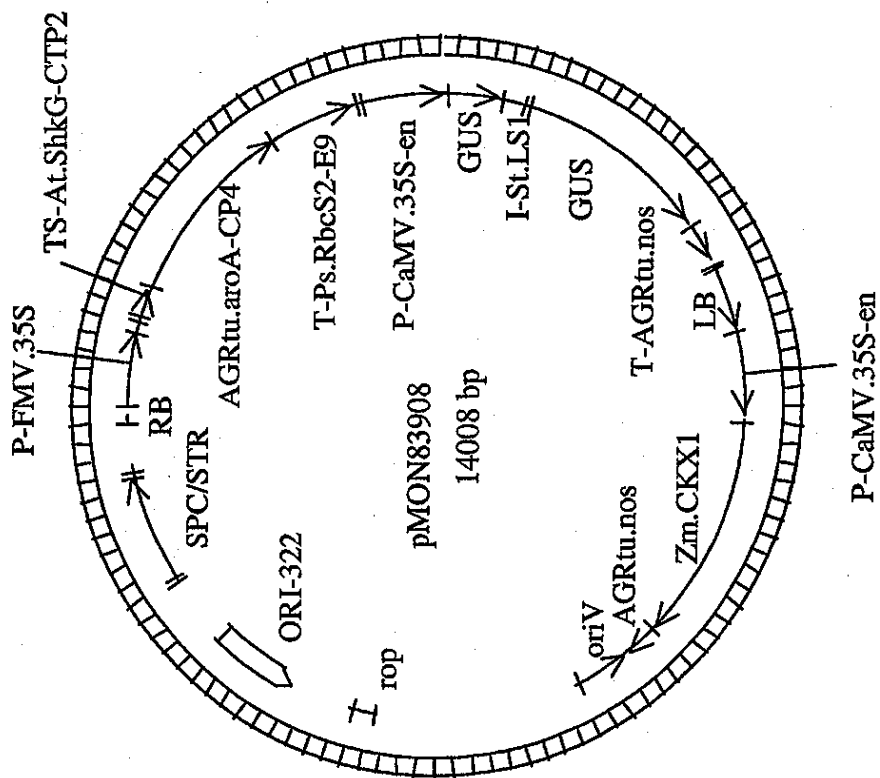


FIG. 25

24

27

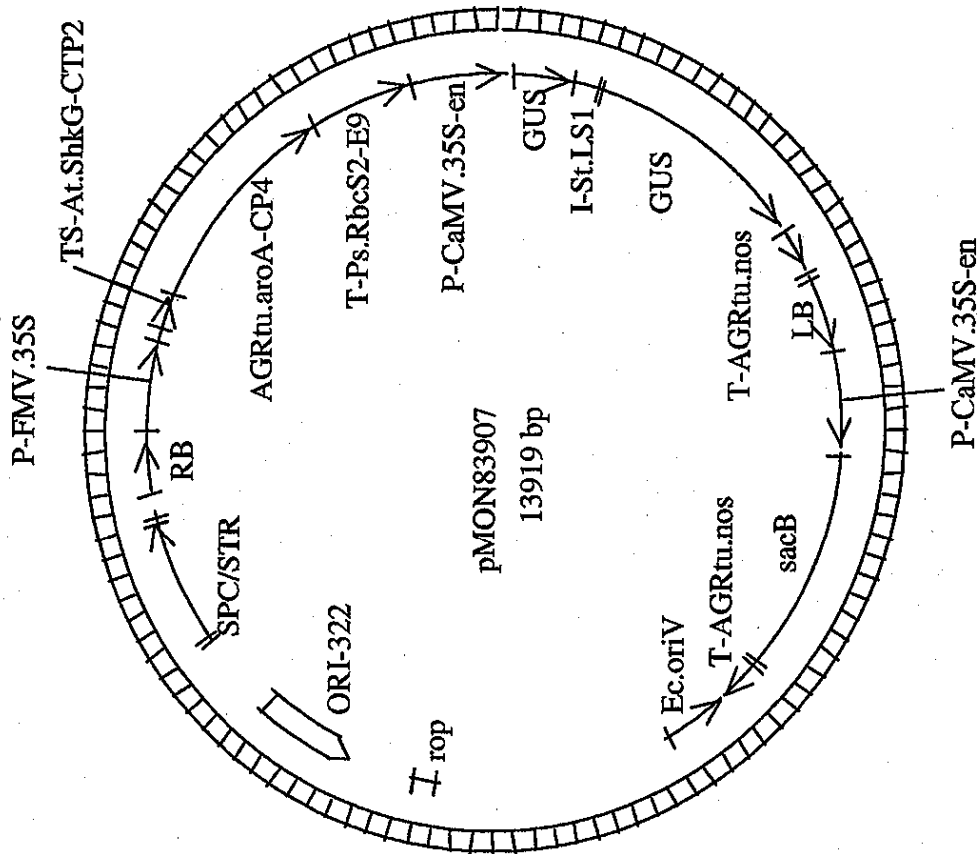


FIG. 26