

29.261



- R E S U M O -

"PROCESSO PARA MODIFICAR GENETICAMENTE UMA CÉLULA VEGETAL DE MODO A OBTEREM-SE PLANTAS RESISTENTES A INSECTOS"

Descreve-se um processo para modificar geneticamente uma célula vegetal mediante a introdução de genes estruturais de proteínas insecticidas expressáveis em genomas de plantas.

Nas formas de realização preferidas, o presente invento compreende situar um gene estrutural de uma proteína cristalina de Bacillus thuringiensis sob o controlo de um promotor vegetal ou de T-DNA e antes de um local de polia-denilação, e, em seguida, inserir a referida combinação de promotor/gene estrutural num genoma de uma planta utilizando um sistema de transformação baseado no plásmido Ti de agrobacterium tumefaciens. O plásmido Ti modificado é utilizado em seguida para transformar células de plantas vegetais receptoras.



Descrição do objecto do invento  
que

AGRIGENETICS RESEARCH ASSOCIATES  
LIMITED, norte-americana, indus-  
trial, com sede em 3375 Mitchell  
Lane, Boulder, Colorado, 80301 -  
-2244, Estados Unidos da América,  
pretende obter em Portugal, para  
PROCESSO PARA MODIFICAR GENETICA-  
MENTE UMA CÉLULA VEGETAL DE MODO  
A OBTEREM-SE PLANTAS RESISTENTES  
A INSECTOS"

O presente invento refere-se a um processo para modi-  
ficar, genéticamente uma célula vegetal de modo a obterem-  
-se plantas resistentes a insectos, situando-se assim nas  
áreas da engenharia genética, da agricultura e dos siste-  
mas para a obtenção de compostos bacterianos bio-afectan-  
tes especialmente os derivados do género Bacillus.

O Bacillus thuringiensis, uma espécie de bactéria-in-  
timamente relacionada com B. cereus, forma uma inclusão  
cristalina proteica durante a esporulação. Este cristal  
é para-esporal, formando-se dentro da célula na extremida-  
de oposta ao esporo em desenvolvimento. A proteína crista-  
lina, frequentemente denominada  $\delta$ -endotoxina, possui duas  
formas: uma protoxina não tóxica com peso molecular (PM)  
de aproximadamente 130 quilodaltons (KD), e uma toxina com  
um PM de aproximadamente 67 KD. O cristal contém a protei-  
na de protoxina que é activada nos intestinos de larvas de



um certo número de espécies de insectos. M.J. Klowden et al. (1983) Appl. Envir. Microbiol. 46;312-315, demonstrou que a protoxina solubilizada do B. thuringiensis var. israelensis é tóxica para os Aedes aegypti adultos. Durante a activação, a protoxina é clivada em dois polipeptidos, dos quais um ou ambos são tóxicos. In vivo, o cristal é activado ao ser solubilizado e convertido em forma tóxica pela alcalinidade e protéases do intestino. In vitro, a protoxina pode ser solubilizada por um pH extremamente elevado (p. ex. pH 12) por agentes redutores sob condições moderadamente básicas (p. ex., - pH 10), ou por desnaturantes fortes (guanidium, ureia), sob condições neutras (pH 7) e, uma vez solubilizada, pode ser activada pela acção da tripsina da protease. Tem sido relatado que a proteína cristalina se relaciona antígenicamente com proteínas tanto dentro do tegumento do esporo como da parede da célula vegetativa. Os hidratos de carbono não estão envolvidos nas propriedades tóxicas da proteína.

O B. thuringiensis e a sua endotoxina cristalina são úteis porque o cristal proteico e uma proteína insecticida reconhecidamente venenosa para as larvas de mais de uma centena de espécies de insectos, nomeadamente os das ordens dos Lepidopteros e Dípteros. Os insectos susceptíveis á acção da proteína cristalina do B. thuringiensis incluem, sem porem se limitarem a eles os relacionados na Tabela 1. Muitas dessas espécies de insectos são pragas economicamente importantes. As plantas que podem ser protegidas pela aplicação da proteína cristalina incluem, sem porém se limitarem a elas as relacionadas na Tabela 2. Diferentes variedades de B. thuringiensis, que incluem, sem porém se limitarem a elas as relacionadas na Tabela 3, têm diferentes gamas de hospedeiros (R. N. Faust et al. (1982) in Genetic Engineering in the Plant Sciences, ed. N. J. Panapopoulos, pp, 225-254); provávelmente isto reflecte a toxicidade de uma da proteína cristalina num determinado hospedeiro.



O cristal proteico é altamente específico quanto aos insectos; em mais de duas décadas de aplicação comercial de células esporuladas de B. thuringiensis a safras e plantas ornamentais não tem havido nenhum caso conhecido de efeitos sobre plantas ou animais que não sejam insectos. A eficácia e segurança da endotoxina foram revistas por R. M. Faust et al., supra. Outras revisões úteis incluem as de P.G. Fast (1981) in Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, ed. : H. D. Burges, pp. 223-248, e H. E. Huber & P. Luthy (1981) in Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases, ed. : E. W. Davidson, pp. 209-234.

A presença do gene da proteína cristalina pode geralmente verificar-se num de vários grandes plasmídios que têm sido encontrados no Bacillus thuringiensis, apesar de em algumas variedades o mesmo poder ser encontrado no cromossoma (J. W. Kronstad et al. (1983) J. Bacteriol. 154: 419-428). Vários dos genes foram clonados em plasmídios que podem crescer no E. coli. O grupo de Whiteley (H. R. Whiteley et al. (1982) in Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli, ed. : A.T. Ganesan et al., pp. 131-144, H. E. Schelf & H. R. Whiteley (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2893-2897 e pedido de patente europeu 63.949) relataram a clonagem da toxina do B. thuringiensis, variedade Kurstaki estirpes HD-1-Dipel e HD-73, usando as enzimas Sau3AI (sob condições de digestão parcial) e BglII, respectivamente, para inserir grandes fragmentos portadores de genes, com as dimensões aproximadas de 12 Kbp e 16 Kbp, no local BamHI do vector de plasmídio pBR322 do E. coli. Observou-se que a proteína cristalina HD-1 estava localizada num fragmento HindIII de 6,6 quilobase par (kpb). A proteína cristalina do gene HD-1-Dipel que era tóxica para as larvas, imunologicamente identificável, e do mesmo tamanho que a protoxina autêntica, foi observada a ser produzida por células de E. coli transformadas que continham clones ou sub-clones pBR322. Isto indicava que o gene do Bacillus era transcri-



to, provavelmente pelo seu proprio promotor, e traduzido em E. coli. Adicionalmente, isto sugere que a actividade tóxica do produto da proteína é independente da localização de sua síntese. O facto de o gene se expressar quando o fragmento que o continha era inserido no vector em qualquer uma das orientações, sugere que a transcrição era controlada pelo seu proprio promotor. Os loci de partida transcritos e translativos bem como a sequência deduzida para os aminoácidos de terminal amino 333 da protoxina HD-1-Dipel, foram determinados pela sequenciação do ácido nucleico (H. C. Wong et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:1960-1967). O gene insecticida revelou possuir os esperados pontos de fixação do ribossoma bacteriano e translativo de partida (ATG), juntamente com sequências geralmente encontradas em -10 e -35 (relativamente à extremidade 5' do mRNA) que estão envolvidas, no inicio da transcrição, em bactérias tais como B. subtilis. A Klier et al. (1982) EMBO J. 1: 791-799, comunicaram a clonagem do gene da proteína cristalina do B. thuringiensis, estirpe berliner 1715 em pBR322. Usando a enzima BamHI, um grande fragmento de 14 Kbp contendo gene da proteína cristalina foi introduzido no vector pHV33, que pode reproduzir-se nos E. coli e Bacillus. Em ambos, E. coli e B. subtilis esporulante, o clone baseado em pHV33 dirigiu a síntese de protoxina de dimensão integral (130 KD) que formou corpos de inclusão cito plasmatica e reagiu com anticorpos preparados contra a protoxina autêntica. Extractos de células de E. coli portadores dos plasmidios baseados em pBR322 ou pHV33 foram tóxicos para as larvas. Em trabalho adicional, A. Klier et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11: 3973-3987, transcreveram o gene de proteína cristalina do berliner, in vitro e relataram a sequência da região promotora, juntamente com os 11 primeiros codões da proteína cristalina. Os loci de partida de aderência e translativos do ribossoma bacteriano foram identificados. Apesar de ter sido identificada a esperada sequência "-10", não foi vista no entanto homologia

com outros promotores, próxima de -35. Held et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77/6065-6069 relataram a clonagem de um gene de proteína cristalina da variedade Kurstaki no vector de clonagem baseada no fagócito  $\lambda$ Charon4A. Células de E. coli infectadas com um dos clones Charon produziram antígeno que era de dimensão igual à da protoxina (130 KD) e era tóxico para as larvas. Um fragmento EcoRI de 4,6 Kpb deste clone Charon foi introduzido em pHV33 e num vector de plasmidio de E. coli, pBR328. Novamente, foi produzida proteína cristalina antigénicamente identificável de 130 KD por estirpes de E. coli e B. subtilis, que apresentavam ambos plasmídios apropriados. Uma sequência cromossômica de B. thuringiensis que teve hibridização cruzada com o gene clonado de proteína cristalina foi identificada em estirpes de B. thuringiensis que não produzem proteína cristalina durante a esporulação.

Além da proteína cristalina, o B. thuringiensis produz pelo menos três outras toxinas. Duas das mesmas, a  $\alpha$ -exotoxina e a  $\gamma$ -exotoxina, são enzimas de fosfolipase que degradam lípidos. Sabe-se também que o B. cereus também produz fosfolipases (ou lecitinases) que são tóxicas para larvas de insectos. Outras enzimas bacterianas que estão envolvidas na patogénese de insectos incluem, não se limitando porém a elas hialuronidases, fosfatases, e proteases. A protease produzida pelo Pseudomonas aeruginosa tem demonstrado possuir uma afinidade específica por proteínas de larvas de Galleria mellonella (vide O. Lysenko & M. Kucera (1971) in Microbial Control of Insects and Mites, eds.: H:D. Burges & N. W. Hussey, pp. 205-227).

#### Vectores de Transporte

Os vectores de transporte, desenvolvidos por G.B. Ruvkun e F. M. Ausubel (1981) Nature 298:85-88, fornecem um modo de inserir materiais genéticos estranhos na posição es-



colhida, num grande plasmídeo virus ou genoma. Dois grandes problemas surgem ao lidar-se com grandes plasmídios ou genomas. Em primeiro lugar, os grandes plasmídios podem ter muitos locais para cada enzima de restrição. As reacções singulares de clivagem localizada específicas não são reprodutíveis e as reacções de clivagem em locais múltiplos, seguidas de fixação, levam a grandes dificuldades devidas à mistura dos muitos fragmentos cuja ordem e orientação não se deseja alterar. Em segundo lugar, a eficiência da transformação com grandes plasmídios de DNA é muito baixa. Os vectores de transporte permitem superar essas dificuldades ao facilitarem a inserção, frequentemente in vitro, do material genético estranho num plasmídeo menor, transferindo então geralmente por técnicas in vivo, para o plasmídeo maior

Um vector de transporte consiste numa molécula de DNA, geralmente um plasmídeo, capaz de ser introduzida na bactéria receptora final. O mesmo inclui também uma cópia do fragmento do genoma receptor, no qual o material genético deve ser inserido, e um código segmentar de DNA para uma característica seleccionável, que é também inserida no fragmento de genoma receptora. A característica seleccionável ("marcador") é convenientemente inserida por mutagenese de transposons ou por enzimas restritivas e ligases.

O vector de transporte pode ser introduzido na célula receptora final, tipicamente uma bactéria da família Rhizobiaceae (que contém o género Agrobacterium), por uma união tripla (Ruvkin & Ausubel, supra), transferência directa de um vector auto-mobilizado numa união dupla, tomada directa de DNA exógeno por células de Agrobacterium ("transformação", usando as condições de M.Holsters et al. (1978) Molec. Gen. Genet. 163:181-187), por fusão de esferoplastos de Agrobacterium com outra célula bacteriana, por absorção de DNA encapsulado em lipossoma, ou infecção com um vector de transporte que seja baseado num vírus capaz de ser embalado



in vitro. Uma união tripla envolve a união de uma estirpe contendo um plasmídio mobilizável, que contém genes para mobilização do plasmídio e transferência conjugativa, com a estirpe que contém o vector de transporte. Se o vector de transporte puder ser mobilizado pelos genes do plasmídio, o vector de transporte é transferido para a célula receptora que contém o grande genoma, por exemplo, os plasmídios Ti ou Ri das estirpes de Agrobacterium.

Após o vector de transporte ser introduzido na célula receptora possíveis ocorrências incluem um duplo cruzamento com uma ocorrência de recombinação em qualquer dos lados do marcador. Esta ocorrência resultará em transferência de um segmento de DNA contendo o marcador para o genoma receptor, substituindo um segmento homólogo carente da inserção. Para seleccionar células que tenham perdido o vector de transporte original, o vector de transporte deve ser incapaz de reproduzir-se na célula hospedeira final ou ser incompatível com um plasmídio independentemente seleccionável, pré-existente na célula receptora. Um meio comum de conseguir isto é proporcionar no terceiro genitor um outro plasmídio que seja incompatível com o vector de transporte e que contem um diferente marcador de resistência á droga. Portanto, quando se faz uma selecção para resistência a ambas as drogas, as únicas células sobreviventes são aquelas nas quais o marcador no vector de transporte se tenha recombinado com o genoma receptor. Se o vector de transporte contiver um marcador extra, pode-se então separar e descartar células que contém plasmídios resultantes de uma só ocorrência de cruzamento entre o vector de transporte e o plasmídio receptor, resultando em conglomerados nos quais todo o vector de transporte está integrado no plasmídio receptor. Se o material genético estranho estiver inserido no, ou adjacente ao marcador seleccionado, o mesmo será também integrado no plasmídio receptor como resultado da mesma dupla recombinação. Ele poderia também ser transportado



conjuntamente quando inserido no fragmento homólogo num ponto que não esteja dentro do, ou adjacente ao marcador, porém, quanto maior a distância que separe o material genético estranho do marcador, tanto mais provável será a ocorrência de uma recombinação entre o material genético estranho e o marcador, impedindo a transferência do material genético estranho.

Se o vector de transporte for usado para introduzir uma característica fenotipicamente dominante (por exemplo, um novo gene estrutural insecticida expressável, porém não um gene de T-DNA oncogénico inactivo), não é necessário depender de uma recombinação homóloga dupla. As células resultantes de uma única ocorrência de cruzamento que resulta em plasmídios conjugados podem transferir a característica desejada para o interior de células de plantas. Pode-se mesmo usar uma variante de vector de transporte com uma única sequência ininterrupta de T-DNA. Contudo, como o T-DNA resultante terá agora uma duplicação em par, deve-se estar vigilante em relação a um possível raro supressão do vector de transporte pela ocorrência de um efeito de recombinação homólogo único entre as duas sequências homólogas em qualquer elemento dentro o *Agrobacterium* e as células da planta.

Os vectores de transporte têm demonstrado ser úteis na manipulação de plasmídios de *Agrobacterium*; vide D. J. Garfinkel et al. (1981) *Cell* 27:143-153, A. J. M. Matzke & M. D. Chilton (1981) *J. Molec. Appl. Genet.* 1:39-49, e J. Lee-mans et al. (1981) *J. Molec. Appl. Genet.* 1:149-164, os quais se referiram aos vectores de transporte pelo termo "vectores intermediários".

Uma variação recentemente divulgado do sistema de vector de transporte para inserir alterações em grandes moléculas de DNA é o "vector suicida". Neste sistema, conforme é descrito por A. Puhler et al. Pedido dos E.U.A. Nº de série 510.370 e R. Simon et al. (1983) no prelo, o vector de



transporte não pode ser mantido dentro da célula receptora. Esta propriedade elimina a necessidade de introduzir um plasmídeo incompatível na célula receptora para excluir o vector de transporte, como é comumente feito durante uma união tripla. Todos os vectores que não se integram nalgum DNA já presente efectivamente "cometem suicídio" ao não se replicarem. Como com os tipos tradicionais de vectores de transporte, pode-se distinguir entre homólogos duplos ou simples separados por um gene de resistência a antibióticos que não se situe entre as duas regiões de homologia. O uso de um vector suicida baseado em pBR322 para transferir sequências de DNA para dentro de um plasmídeo Ti foi relatado por E. Van Haoute et al. (1983) EMBO J. 2:411-417, e L. Comai et al. (1982) Plant Molec. Biol. 1:291-300.

Uma alternativa para o uso de vectores de transporte para a introdução de novas sequências de DNA dentro de T-DNA por meio de recombinação homóloga envolve os transposons bacterianos. Conforme descrito na secção Genes de Agrobacterium nos Plasmídios TIP, os transposons podem "pular" para dentro do T-DNA de um plasmídeo TIP vide por exemplo, D. J. Garfinkel et al. (1981) Cell 27:143-153). Caso o transposon seja modificado in vitro pela inserção da nova sequência, aquele novo DNA pode ser transfrido para dentro do T-DNA do plasmídeo TIP pelo transposon. O TIP pode então transferir a nova combinação DNA transposon T-DNA para uma célula de planta quando o mesmo estiver estavelmente integrado.

Incluídas na família bacteriana gram-negativa Rhizobiaceae no género Agrobacterium estão as espécies A. tumefaciens e A. rhizogenes. Essas espécies são, respectivamente, os agentes causadores da doença do bugalho e da doença das raízes fibrosas nas plantas. A doença do bugalho é caracterizado pelo crescimento de um bugalho de tecido não diferenciado. A raiz fibrosa é um teratoma caracterizado pela indução inadequada de raízes no tecido infectado.



Em ambas as doenças, o tecido vegetal impropriamente desenvolvido produz um ou mais derivados de aminoácidos, conhecidos como opinas, não produzidos normalmente pela planta, que são catabolizados pela bactéria infectante. As opinas conhecidas têm sido classificadas em três famílias principais cujos membros-tipo são a octopina, a nopalina e a agropina. As células de tecidos com crescimento inadequado podem ser desenvolvidas em cultura e, sob condições apropriadas, ser regeneradas em plantas completas que retêm certos fenótipos transformados.

Estirpes virulentas de Agrobacterium grandes plasmídios conhecidos por plasmídios II (indutores de tumor) no A. tumefaciens e plasmídios Ri (indutores de raízes) no A. rhizogenes. A cura de uma estirpe desses plasmídios resulta numa perda de patogenicidade. O plasmídio Ti contém uma região, denominada T-DNA (DNA transferido) que nos tumores, se verifica estar integrado no genoma da planta hospedeira. O T-DNA codifica várias transcrições. Estudos mutacionais têm demonstrado que algumas dessas estão envolvidas na indução de crescimento tumeroso. Mutantes nos genes para tml, tmr, e tms, resultam respectivamente em grandes tumores (no tabaco), numa propensão para gerar raízes e numa tendência para a indução de ramificações. O T-DNA também codifica um gene de pelo menos uma síntese de opina, e os plasmídios Ti são frequentemente classificados pela opina cuja síntese eles provocaram. Cada um dos genes de T-DNA está sob o controle de um promotor de T-DNA. Os promotores de T-DNA assemelham-se na sua estrutura a promotores eucarióticos, e parecem funcionar apenas na célula vegetal transformada. O plasmídio Ti também contém genes fora da região do T-DNA. Esses genes estão envolvidos em funções que incluem o catabolismo da opina, oncogenicidade, sensibilidade à agrocina, replicação, e auto-transferência para as células bacterianas. O plasmídio Ri está organizado de um modo análogo ao plasmídio Ti. O conjunto de genes e sequências de



DNA responsáveis pela transformação da célula vegetal é doravante denominado colectivamente como o princípio indutor de transformação (TIP). A designação TIP inclui, portanto, ambos os plasmídios Ti e Ri. O segmento integrado de um TIP e aqui denominado "T-DNA" (DNA transferido), quer seja derivado de um plasmídeo Ti ou de um plasmídeo Ri.

M., D. Chilton (Junho de 1983) *Sci. Amer.* 248(6): 50-59, apresentou recentemente um artigo introdutório sobre o uso dos plasmídios Ti como vectores. Recentes revisões gerais sobre doenças causadas pelo Agrobacterium incluem as de D. J. Merlo (1982). *Adv. Plant Pathol.* 1:139-178, L. W. Ream & M. P. Gordon (1982), *Science* 218:854-859, e M.W. Bevan & M.-D. Chilton (1982), *Ann. Rev. Genet.* 16:357-384; G. Kahl & J. Schell (1982) Molecular Biology of Plant Tumors, e K. A. Barton & M. -D. Chilton (1983) *Met. Enzymol.* 101:527-539.

#### Infeção de Tecidos Vegetais pelo Agrobacterium

As células vegetais podem ser transformadas pelo Agrobacterium através de um certo número de métodos conhecidos da técnica que incluem, não se limitando a eles a cultura conjunta de células vegetais com o Agrobacterium, infecção directa de uma planta, fusão de protoplastos de planta com esferoplastos de Agrobacterium, transformação directa pela absorção de DNA livre pelos protoplastos de células vegetais, transformação de protoplastos, com paredes celulares parcialmente regeneradas pela transformação de protoplastos por bactérias intactas, por lipossomas contendo T-DNA, o uso de um vírus para conter o T-DNA, micro-injecção, e semelhantes. Qualquer método será suficiente desde que o gene seja expresso fielmente, e seja transmitido estavelmente através de mitose e meiose.

A infecção de tecido vegetal pelo Agrobacterium é uma



técnica simples, bem conhecida dos especialistas da arte (como exemplo, vide D. N. Butcher et al. (1980) in Tissue Culture Methods for Plant Pathologists, eds.: D. S. Ingram & J. P. Helgeson, pp. 203-208). Tipicamente, uma planta é ferida por qualquer um dentre um certo número de modos, que incluem o corte com uma navalha, perfuração com uma agulha, ou friccionamento com um abrasivo. O ferimento é então inoculado com uma solução contendo bactérias indutoras de tumores. Uma alternativa à infecção de plantas intactas é a inoculação de pedaços de tecidos tais como discos de tubérculos de batatas (D. K. Anand & G. T. Heberlein (1977) Amer. J. Bot. 64: 153-158) ou segmentos de hastes de tabaco (K.A. Barton, et al. (1983) Cell 32:1033-1043). Após a indução, os tumores podem ser colocados em cultura de tecido, em meios carentes de fito-hormona. O crescimento independente de hormóni é típico do tecido vegetal transformado e está em grande contraste com as condições usuais de crescimento de tal tecido em cultura (A. C. Braun (1956) Cancer Res. 16:53-56).

O Agrobacterium também é capaz de infeccionar células isoladas e células criadas em cultura (L. Marton et al. (1979) Nature 277:129-131), e protoplastos mesófilos do tabaco. Nesta última técnica, após se dar algum tempo para a regeneração parcial de novas paredes celulares, as células do Agrobacterium foram acrescentadas à cultura durante um certo período sendo então mortas pela adição de antibióticos. Apenas as células expostas às células de A. tumefaciens contendo o plasmídeo Ti foram capazes de formar calos ao serem colocadas em meios carentes de hormónio. A maioria dos calos demonstrou conter uma actividade enzimática envolvida no anabolismo da opina. Outros pesquisadores (R.B. Horsch & R. T. Fraley (18 de Janeiro de 1983) 15th Miami Winter Symposium) relataram transformações pela cultura conjunta que conduziu a uma elevada taxa (maior que 10%) de calos que apresentavam crescimento independente de hormónio com 95% desses calos produzindo opinas. M. R. Davey et al.



(1980) in Ingram & Helgeson, *supra*, pp. 209-219, descrevem a infecção de células mais antigas que haviam sido regeneradas de protoplastos.

Os protoplastos de plantas podem ser transformados pela tomada directa de plasmídios TIP. M. R. Davey *et al.* (1980) *Plant Sci. Lett.* 18:307-313, e M. R. Davey *et al.* (1980) in Ingram & Helgeson, *supra*, conseguiram transformar protoplastos com o plasmídio T1 na presença de poli-L- $\alpha$ -ornitina num fenotipo de síntese de opina e de crescimento hormonal independente em cultura. Foi subsequentemente demonstrado (J. Draper *et al.* (1982) *Plant and Cell Physiol.* 23:451-458, M. R. Davey *et al.* (1982) in *Plant Tissue Culture 1982*, ed: A. Fujiwara, pp. 515-516) que o polietileno glicol estimulava a absorção de plasmídio T1 e que algumas sequências de T-DNA eram integradas no genoma. F. A. Krens *et al.* (1982) *Nature* 296:72-74, relataram resultados similares usando polietileno glicol seguido de um choque com cálcio, apesar de os seus dados sugerirem que o T-DNA integrado incluía sequências laterais de plasmídio T1.

Um método alternativo para se conseguir a absorção de DNA envolve a uso de lipossomas. A preparação de lipossomas contendo DNA e ensinada por Papahadjopoulos nas Patentes dos EUA 4.078.052 e 4.235.871. Preparados para a introdução de T1-DNA através de lipossomas têm sido relatados (T Nagata *et al.* (1982) in Fujiwara, *supra*, pp. 509-510, e T. Nagata (1981) *Mol. Gen. Genet.* 184:161-165). Um sistema análogo envolve a fusão de células vegetais e bacterianas após a remoção das suas paredes celulares. Um exemplo desta técnica é a transformação de protoplastos de Vinca por esferoplastos de Agrobacterium, relatada por S. Haszawa *et al.* (1981) *Mol. Gen. Genet.* 182:206-210. Os protoplastos de plantas podem absorver células de Agrobacterium delimitadas por parede celular (S. Hasezawa *et al.* (1982) in Fujiwara, *supra* pp. 517-518).



O T-DNA pode ser transmitido ao tecido regenerado de uma fusão de dois protoplastos, dos quais apenas um foi transformado (G. J. Wullems et al. (1980) *Theor. Appl. Genet.* 56:203-208). Conforme detalhado na secção sobre Regeneração de Plantas, o T-DNA pode passar através da meiose e ser transmitido à progénie como uma simples característica Mendeliana.

#### Agrobacterium--Regeneração de Plantas

Tecidos vegetais diferenciados com morfologia normal têm sido obtidos de tumores de bugalho. A. C. Braun & H. N. Wood (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:496-500, implantaram teratomas de tabaco em plantas normais e conseguiram obter ramificações de aparência normal que podiam florescer. As ramificações retiveram a capacidade de produzir opinas e crescer independentemente de fito hormónios quando colocadas em cultura. Nas plantas estudadas, não se observou que estes fenótipos tumorosos fossem transmitidos à progénie, perdendo-se aparentemente, durante a meiose (R. Turgeon et al. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3562-3564). As plantas que haviam espontâneamente perdido as propriedades tumorosas, ou que eram derivadas de semente de teratoma demonstraram inicialmente ter perdido todo o seu T-DNA. F. -M. Yang et al. (1980) *In Vitro* 16:87-92; F. Yang et al. (1980). *Mol. Gen. Genet.* 177:707-714, M. Lemmers et al. (1980) *J. Mol. Biol.* 144:353-376). Contudo, trabalhos subsequentes com plantas que haviam revertido após tratamento hormonal (1 mg/l de cinetina) mostraram que as plantas que haviam passado por meio se, apesar de haverem perdido os genes de T-DNA responsáveis pelo fenotipo transformado, poderiam reter sequências homólogas a ambas as extremidades do T-DNA (F. Yang e R. B. Simpson (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4151-4155). Adicionalmente G. J. Wullems et al. (1981) *Cell* 24:719-724, demonstraram que os genes envolvidos no anabolismo da opina eram capazes de passar através



da meiose, mesmo se as plantas fossem machos estéreis e que o T-DNA aparentemente inalterado pudesse ser herdado de maneira Mendeliana (G. Wullems et al. (1982) in Fujiwara, supra) L. Otten et al. (1981) Molec. Gen. Genet: 183:209-213, utilizou mutantes de plasmídeo Ti gerados pelo transposon Tn7 no local tms (indutor de ramificações) para criar tumores que proliferavam ramificações. Quando essas ramificações foram regeneradas em plantas, demonstraram originar flores auto-fertilizadas. As sementes resultantes germinaram em plantas que continham T-DNA e produziam opinas. Em experiências subsequentes, H. DeGreve et al. (1982) Nature 300:752-755 descobriram que a sintase de octopina pode ser herdada como um único gene Mendeliano dominante. Contudo, o T-DNA sofrerá extensa supressão de funções que não a ocs, ao passar pela regeneração a partir do calo. Experiências similares com um mutante tmr (indutor de raízes) mostraram que um T-DNA de comprimento integral poderia ser transmitido à progênie através de meiose, que, nessa progênie poderiam estar expressos genes de nopalina, apesar de a níveis variados e que o gene I co-transformado de desidrogenase de álcool de levedo não estava expresso (K. A. Barton et al. (1983) Cell 32:1033-1043). Parece agora que os tecidos regenerados que carecem de sequências de T-DNA descendem provavelmente de células não transformadas que "contaminam" o tumor (G. Ooms et al. (1982) Cell 30:589-597). Um recente trabalho de A. N. Binns (1983) Planta 158:272-279, indica que os genes tumoro gênicos, neste caso tmr, podem ser "desligados" durante a regeneração e "religados" ao colocar-se o tecido regenerado em cultura.

As raízes resultantes da transformação de A. rhizogenes têm demonstrado ser relativamente fáceis de regenerar diretamente em platinhas (M.-D. Chilton et al. (1982) Nature 295:432-434.

Genes de Agrobacterium nos Plasmídios TIP



Um certo número de genes tem sido identificado dentro do T-DNA dos plasmídios TIP. Cerca de meia dúzia de transcrições do T-DNA de plasmídios de octipina foram inventariadas (S. B. Gelvin et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:76-80, L. Willmitzer et al. (1982) EMBO J. 1:139-146) e algumas funções indicadas (J Leemans et al. (1982) EMBO J. 1:147-152). Algumas dessas transcrições, especialmente as da região com as codificações tmr e tms, podem também ser transcritas em células procarióticas (G. Schröder et al. (1983) EMBO J. 2:403-409). Os quatro genes de um plasmídio do tipo octopina que foram bem definidos por mutagénesse do transposon incluem tms, tmr, e tml (D. J. Garfinkel et al. (1981) Cell 27:143-153). Os plasmídios Ti que contém mutações nesses genes incitam respectivamente calos tumorosos de Nicotiana tabacum que geram ramificações, proliferam raízes, e são maiores que os normais. Noutros hospedeiros, os mutantes desses genes podem induzir diferentes fenótipos (vide M. W. Bevan & M.-D. Chilton (1982) Ann. Rev. Genet. 16:357-384). Os fenótipos de Tms e tmr estão correlacionados com diferenças nos níveis de fito hormônio presentes no tumor. As diferenças nas razões de citocinina:auxina são similares às que, na cultura, induzem a ramificação ou a formação de raízes em tecido de calos não transformada (D. E. Akiyoshi et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:407-411). O T-DNA contendo um gene funcional quer para tms como para tmr isolados mas não para o tml funcional sózinho, pode promover um significativo crescimento tumoral. A promoção de ramificações e raízes é respectivamente estimulada e inibida pelo tml funcional (L. W. Ream et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1660-1664. As mutações em genes de T-DNA não parecem afectar a inserção do T-DNA dentro do genoma da planta (Leemans et al. (1982) supra, Ream et al. (1983) supra). o gene ocs codifica a sintase de octopina, que foi sequenciada por H. De Greve et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:499-511). O mesmo não contém introns (sequências intervenientes encontradas comumente



em genes eucarióticos que são desligados pós-transcritivamente para fora do precursor mensageiro durante a maturação do mRNA). O mesmo tem sequências que se assemelham a um sinal transcrito encariótico ("caixa TATA"), e um local de poliadenilação. Todos os sinais necessários para a expressão do gene ocs são encontrados dentro de 295 bp do local transcritivo de partida do ocs (C. Koncz et al. (EMBO J. 2:1597-1603).

Os plasmídios Ti de nopalina codificam o gene da sintase de nopalina (nos), que foi sequenciado por A. Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-573. Tal como se verificou em relação ao gene ocs, o nos não é interrompido por introns. Possui dois locais putativos de poliadenilação e uma "caixa TATA" potencial. Em contraste com o ocs o nos é precedido de uma sequência que pode ser um sinal transcritor conhecido como uma "caixa CAT". Todos os sinais necessários para a expressão do gene nos são encontrados dentro de 261 pb do local transcritivo de partida do nos (C. Koncz et al., supra). Um gene para a sintase de agrocinopina e genes equivalentes a tms e tmr foram identificados num plasmidio do tipo nopalina (H. Hoos et al. (1983) Cell 32:1057-1067, um certo número de transcrições foi mapeado (L. Willmitzer et al. (1983) Cell 32:1045-1056). J.C. McPherson et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2666-2670, relataram a translação in vitro de mRNAs codificados em T-DNA, de tecidos de bugalho.

A transcrição do T-DNA da raiz fibrosa foi também detectada (L. Willmitzer et al. (1982) Mol. Gen. Genet. 186:16-22). Funcionalmente, o síndrome de raiz fibrosa parece ser equivalente à de um tumor de bugalho incitado por um plasmidio Ti transformado em tmr (F. F. White & E. W. Nester (1980) J. Bacteriol. 144:710-720).

Nos eucariotas, a metilação (especialmente de resíduos



de citosina) do DNA está correlacionada com a inactivação transcritiva; os genes que estão relativamente sub-metilados são transcritos em mRNA. S. B. Gelvin et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:159-174, verificaram que o T-DNA nos tumores de bugalho está sempre presente em pelo menos uma cópia não metilada. O facto de o mesmo genoma poder conter numerosas outras cópias de T-DNA que são metiladas sugere que as cópias de T-DNA superiores a um podem ser biologicamente inertes. (Vide também G. Ooms et al. (1982) *Cell* 30:589-597).

O plasmidio Ti codifica outros genes que estão fora da região do T-DNA e são necessários ao processo de infecção. (Vide M. Holsters et al. (1980) *Plasmid* 3:212-230 quanto aos plasmídios de nopalina, e H. De Greve et al. (1981) *Plasmid* 6:235-248, D. J. Garfinkel e E. W. Nester (1980) *J. Bacteriol.* 144:732-743, e G. Ooms (1980) *J. Bacteriol.* 144:82-91 quanto aos plasmídios de octopina). Mais importantes são os genes onc, que, quando modificados resultam em plasmídios Ti incapazes de oncogenicidade. (Estes locais são também conhecidos como vir, para virulência). Vários genes onc tem sido mapeados com precisão e têm demonstrado estar localizados em regiões conservadas entre vários plasmídios Ti (H. J. Klee et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:878-883, V. N. Iyer et al. (1982) *Mol. Genet.* 188:418-424). Os genes onc funcionam em trans, sendo capazes de causar a transformação de células vegetais com T-DNA de um diferente tipo de plasmidio e fisicamente localizado em outro plasmida (J. Hille et al. (1982) *Plasmid* 7:107-118, H. J. Klee et al. (1982) *J. Bacteriol.* 150:327-331, A. J. de Framond et al. (1983) *Biotechnol.* 1:262-269). O DNA de Ti de nopalina possui repetições directas de cerca de 25 pares de base imediatamente adjacentes aos limites esquerdo e direito do T-DNA, que poderiam estar envolvidos quer na excisão do plasmidio Ti quer na integração dentro do genoma hospedeiro (N. S. Yadav et al. (1982) *Proc. Natl. Acad.*



Sci. USA 79:6322-6326), e uma sequência homóloga foi observada adjacente ao limite de T-DNA da octopina (R.B.Simpson et al. (1982) Cell 29:1005-1014). O catabolismo da opina é especificado respectivamente, pelos genes occ e noc de plasmídios de octopina e de nopalina. O plasmídio Ti também codifica funções necessárias a sua própria reprodução, incluindo uma origem de replicação. Transcrições de plasmídio Ti foram detectadas em células de A. tumefaciens por S. B. Gelvin et al. (1981) Plasmid 6:17-29, os quais verificaram que regiões as de T-DNA eram fracamente transcritas juntamente com sequências que não eram de T-DNA. As características determinadas pelo plasmídio Ti foram revistas por Merlo, supra (vide especialmente a Tabela II), e Ream & Gordon, supra.

#### DNA do Plasmídio Tip do Agrobacterium

Diferentes plasmídios Ti do tipo octopina são quase 100% homólogos uns aos outros quando examinados por hibridização de DNA (T.C. Currier & E. W. Nester (1976) J. Bacteriol. 126:157-165) ou análise com enzima de restrição (D. Sciaky et al. (1978) Plasmid 1:238-253). Os plasmídios Ti do tipo nopalina têm tanto como 67% de homologia entre si (Currier & Nester, supra). Uma pesquisa revelou que diferentes plasmídios Ri são muito homólogos uns aos outros (P. Costantino et al. (1981) Plasmid 5:170-182). N. H. Drummond & M. -D. Chilton (1978) J. Bacteriol. 136:1178-1183, mostraram que secções proporcionalmente pequenas de plasmídios Ti do tipo octopina e nopalina eram homólogas umas às outras. Essas homologias foram mapeadas detalhadamente por G. Engler et al. (1981) J. Mol. Biol. 152:183-208). Os mesmos verificaram que três das quatro regiões homólogas eram subdivididas em três (sobrepondo-se ao T-DNA), quatro (contendo alguns genes onc), e nove (tendo genes onc) sequências homólogas. A homologia ininterrupta contém pelo menos um gene tra (para transferência conjugada do plasmídio Ti a outras células bacterianas,) e



genes envolvidos em replicação e incompatibilidade. Esta região ininterrupta possui homologia com um plasmídeo Sym (envolvido na fixação simbiótica do nitrogénio de uma espécie de Rhizobium, um género diferente na família Rhizobiaceae R. K. Prakash et al. (1982) Plasmid 7:271-280). A ordem das quatro regiões não se conserva apesar de estarem todas elas orientadas na mesma direcção. Parte da sequência do T-DNA é altamente conservada entre os plasmídeos de nopalina e octopina (M.-D. Chilton et al. (1978) Nature 275: 147-149, A. Depicker et al. (1978) Nature 275:150-153). Os plasmídeos Ri têm demonstrado possuir extensa homologia entre si, e aos plasmídeos Ti da octopina (F. F. White & E. W. Nester (1980) J. Bacteriol. 144:710-720) e da nopalina (G. Risuleo et al. (1982) Plasmid 7:45-51), primariamente nas regiões que codificam genes onc. O T-DNA Ri contém homologias extensas, se bem que fracas, ao T-DNA de ambos os tipos de plasmídeo Ti (L. Willmitzer et al. (1982) Mol. Gen. Genet. 186:16-22). O DNA de plantas de Nicotiana glauca não infectada contém sequências, denominadas cT-DNA (T-DNA celular), que apresentam homologia com uma parte do T-DNA Ri (F.F. White et al. (1983) Nature 301:348-350, L. Spanõ et al. (1982) Plant Molec. Biol. 1:291-300), G. A. Huffman et al. (1983) J. Bacteriol., inventariaram a região de hibridização cruzada e demonstraram que o plasmídeo pRiA4b está mais intimamente relacionado com um pTiA6 (do tipo octopina) que o pTiT37 (do tipo nopalina) e que este plasmídeo Ri parece trazer sequências homólogas ao tms, porém não ao tmr. Os seus resultados também sugerem que o T-DNA de Ri pode ser descontínuo, análogo ao caso do T-DNA de octopina.

Tem sido demonstrado que uma parte do plasmídeo Ti (T. -D. Chilton et al. (1977) Cell 11:263-271) ou Ri (M.-D. Chilton (1982) Nature 295:432-434, F. F. White et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3193-3197, L. Willmitzer (1982) Mol. Gen. Genet. 186: 16-22) se encontra no DNA de células vegetais tumorais. O DNA transferido é



conhecido por T-DNA. O T-DNA entrega-se no DNA hospedeiro (M. F. Thomashow et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6448-6452, N. S. Yadav et al. (1980) Nature 287:458-461) no núcleo (M. P. Nuti et al. (1980) Plant Sci. Lett. 18:1-6, L. Willmitzer et al. (1980) Nature 287:359-361), M. -D. Chilton et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4060-4064).

M. F. Thomashow et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6448-6452, e M. F. Thomashow et al. (1980) Cell 19:729-739, verificaram que o T-DNA de plasmídios Ti do tipo octopina havia sido integrado em duas secções separadas, TL-DNA e TR-DNA, T-DNAs esquerdo e direito, respectivamente. O número de cópias do TR e do TL pode variar (D.J. Merlo et al. (1980) Molec. Gen. Genet. 177:637-643). Um núcleo de T-DNA é altamente homólogo ao T-DNA de nopalina (Chilton et al. (1978) supra, e Depicker et al. (1978) supra), é necessário para a manutenção do tumor, encontra-se no TL, está geralmente presente numa cópia por célula, e codifica os genes tms, tmr, e tml. Por outro lado, o TR pode ser totalmente dispensado (M. De Beuckeleer et al. (1981) Molec. Gen. Genet. 183:283-288, G. Ooms et al. (1982) Cell 30:589-597), apesar de ser encontrado em um maior número de cópias (Merlo et al. (1980) supra). G. Ooms et al. (1982) Plasmid 7:5-29, levantaram a hipótese de o TR estar envolvido na integração do T-DNA, apesar de considerarem que quando o TR é cancelado no plasmidio Ti, o A. tumefaciens retém alguma virulência. G. Ooms et al. (1982) Cell 30:589-597, demonstraram que apesar do T-DNA ser ocasionalmente cancelado após a integração no genoma da planta, é geralmente estável e que os tumores contendo uma mistura de células que diferem em organização do T-DNA, são o resultado de múltiplas ocorrências de transformação. O ocs encontra-se no TL mas pode ser cancelado do genoma da planta sem perda de fenótipos relacionados com o crescimento tumoral. Observou-se que o limite esquerdo do TL integrado é



composto de repetições de sequências de T-DNA que têm orientações quer directas, quer invertidas (R. B. Simpson et al. (1982) Cell 29:1005-1014).

Em contraste com a situação em tumores do tipo octopina, o T-DNA de nopalina está integrado dentro do genoma hospedeiro num fragmento contínuo (M. Lemmers et al. (1980) J. Mol. Biol. 144: 353-376, P. Zambryski et al. (1980) Science 209:1385-1391). Foram observadas repetições paralelas directas. O T-DNA de plantas regeneradas de teratomas possuía pequenas modificações nos fragmentos liminares do DNA inserido (Lemmers et al., supra). A análise sequencial da junção entre os limites direito e esquerdo revelou um certo número de repetições directas e uma repetição invertida. A última abarcava toda a junção (Zambryski et al. (1980) supra). A junção esquerda tem demonstrado variar em pelo menos 70 pares de base, enquanto que a junção direita varia em não mais que um único nucleótido. (P. Zambryski et al. (1982) J. Molec. Appl. Genet. 1:361-370). Os limites esquerdo e direito em junções de disposições paralelas estavam separados por espaçadores que poderiam ter mais que 130 bp. Os espaçadores eram de origem desconhecida e continham algumas sequências de T-DNA. Verificou-se que o T-DNA estava integrado em sequências hospedeiras simultaneamente repetidas e com baixo número de cópias. H. Joos et al. (1983) 32:1057-1067, demonstraram que a virulência não é eliminada após o cancelamento de qualquer dos limites usuais de T-DNA da nopalina.

Simpson et al. (1982) supra, e Zambryski et al. (1980) supra sugeriram que as repetições directas nas regiões liminares estão envolvidas na integração do T-DNA no DNA da planta. O facto de os T-DNA, tendo limites de dois diferentes plasmidas Ti, serem menos especificamente integrados que os limites homólogos sustenta esta sugestão (G. Ooms et al. (1982) Plant Molec. Biol. 1:265-276).



N. S. Yadav et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6322-6326, descobriram um locus chi, que no bacteriófago  $\lambda$  faz com que aumente a recombinação geral no DNA envolvente até uma distância de 10 quilobases, num plasmídeo Ti de nopalina, logo fora da extremidade esquerda do T-DNA. R. B. Simpson et al. (1982) Cell 29:1005-1014, não observaram uma sequência chi num plasmídeo Ti de octopina, apesar de o possível raio de ação não elimine a possibilidade de um ser necessário e estar presente, mas fora da região sequenciada. O significado do chi no plasmídeo Ti não é conhecido. Se o chi tiver uma função, é provavelmente usado nas células do Agrobacterium e não nas plantas, pois o chi não se encontra dentro do T-DNA.

#### Manipulações dos Plasmídios TIP pelo Agrobacterium

Conforme o detalhado na secção sobre Vectores de Transporte, tem sido desenvolvida tecnologia para a introdução de sequências alteradas de DNA em locais desejados, num plasmídeo TIP. Os transposons podem ser facilmente inseridos usando-se esta tecnologia (D. J. Garfinkel et al. (1981) Cell 27:143-153). J. -P. Hernalsteen et al. (1980) Nature 287:654-656 têm demonstrado que uma sequência de DNA (aqui um transposon) bacteriano inserido no T-DNA do plasmídeo Ti é transferido e integrado no genoma da planta hospedeira. Apesar de a inserção de DNA estranho ter sido realizada com um certo número de genes de diferentes fontes, até ao presente os genes estranhos não se têm geralmente expressado sob o controlo de seus próprios promotores. As fontes desses genes incluem a desidrogenase de álcool (Adh) do lêvedo (K. A. Barton et al. (1983) Cell 32:1033-1043), AdhI (J. Bennetzen, não publicado) e zeína do milho, interferon e globina de mamíferos, e o vírus SV40 de mamíferos (J. Schell não publicado). Contudo, quando o gene de sintase de nopalina foi inserido no T-DNA de octopina e transformado em tecido vegetal, demonstrou ser totalmente funcional (C. L.



Fink (1982) tese de Mestrado em Ciências, Universidade de Wisconsin-Madison). A faseolina codificadora de genes a proteína de armazenagem encontrada nas sementes do feijão Phaseolus vulgaris L., tem sido transferida para e expressada em, tumores de girassóis. Este último trabalho constitui o primeiro exemplo de um gene de planta a expressar-se sob controlo do seu próprio promotor em tecido vegetal estranho. A transcrição começou e parou nas posições correctas, e os introns foram adequadamente processados post-transcritivamente (T. C. Hall et al., pedido dos E.U.A. Nº de Série 485.613, que é incorporado ao presente através de referência. M. Holsters et al. (1982) Mol. Gen. Genet. 185:283-289, mostraram que um transposon bacteriano (Tn7) inserido no T-DNA, poderia ser recuperado sob uma forma totalmente funcional e aparentemente inalterada após integração num genoma vegetal.

Os cancelamentos podem ser gerados num plasmidio TIP por vários métodos. Pode-se usar vectores de transporte para introduzir cancelamentos construídos por técnicas padrão de recombinação de DNA (Cohen & Boyer, Patente dos E.U.A. 4.237.224). Cancelamentos com uma extremidade predeterminada podem ser criados pela excisão imprópria de "transposons" (B. P. Koekman et al. (1979) Plasmid 2:347-357, e G. Ooms et al. (1982) Plasmid 7:15-29. J. Hille & R. Schilperoot (1981) Plasmid 6:151-154, demonstraram que cancelamentos tendo ambas extremidades em posições predeterminadas podem ser gerados pelo uso de dois transposons. A técnica pode também ser utilizada para construir moléculas de "DNA recombinante" in vivo.

O gene da sintase da nopalina tem sido usado para a inserção de segmentos de DNA que codificam para a resistência às drogas, os quais podem ser usados para fazer a seleção de células vegetais transformadas. Nas células vegetais, o gene de resistência à Kanamicina do Tn5 não é trans



crito sob controle de seu próprio promotor (J. D. Kemp et al (18 de maio de 1982) Beltsville Symp. VII, Beltsville, MD, a ser publicado (1983) in Genetic Engineering: Applications to Agriculture, ed. L. D. Owens; e C. L. Fink (1982) supra). M. W. Bevan et al. (1983) Nature 304:184-187 e R. T. Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807, inseriram o gene de resistencia à Kanamicina (fosfotransferase de neomicina II) do Tn5 atrás do (isto é, sob o controle do) promotor da nopalina. A construção foi usada para transformar células vegetais que, na cultura, apresentavam resistência à Kanamicina e seus análogos, tais como o G418. J. Schell et al. (18 de Janeiro de 1983) 15th Miami Winter Symp. (vide também J. L. Marx (1983) Science 219:830), relataram uma construção similar, na qual o gene de resistência ao metotrexato (redutase de dihidrofolato) do Tn7 era colocado atrás do promotor da sintase da nopalina. As células transformadas eram resistentes ao metotrexato. Similarmente, L. Herrera Estrella et al. (1983) Nature 303:209-213, obtiveram a expressão, em células vegetais, da sintase de octopina e de acetiltransferase do cloranfenicol, uma enzima que, nas bactérias, confere resistência ao cloranfenicol, ao colocar os genes estruturais dessas duas enzimas sob o controle de promotores nos.

T. C. Hall et al., pedido dos E.U.A. Nº de Série 485.614, que é incorporado ao presente através de referência, fundiu o promotor ocs e a extremidade 5' do gene estrutural da sintase da octopina ao gene estrutural da proteína faseolina da semente de feijão. Uma proteína de fusão tendo o término amino da sintase de octopina e carecendo do término de amino da faseolina foi produzida sob o controle do promotor do T-DNA. Os introns, que foram fornecidos pelas sequências de faseolina, foram adequadamente processados pós-transcritivamente.

A. J. de Framond et al. (1983) Biotechnol. 1:262-269, relataram isso na construção de um "plasmídeo mini-Ti". No



T-DNA da nopalina existe apenas normalmente um locus seccionado pela enzima de restrição KpnI. Um mutante sem esse locus foi construído e um fragmento de KpnI, contendo todo o T-DNA de nopalina foi isolado. Este fragmento, juntamente com um gene de resistência à Kanamicina, foi inserido em pRK290, resultando daí um plasmídeo que podia ser mantido na A. tumefaciens e carecia de quase todas as sequências Ti que não eram de T-DNA. Este plasmídeo por si só não era capaz de transformar células vegetais. Contudo, quando colocado numa estirpe de A. tumefaciens contendo um plasmídeo Ti de octopina, foram provocados tumores que sintetizavam tanto a octopina como a nopalina. Os plasmídios mini-Ti foram também transferidos para o interior de células vegetais quando complementados com um plasmídeo Ti cancelado quanto ao seu próprio T-DNA. Esses resultados indicavam que as funções não T-DNA actuaram em trans com o T-DNA, que as funções ausentes do plasmídeo Ti da nopalina foram complementadas pelo plasmídeo Ti da octopina, e que o "mini-Ti" da nopalina era funcional na transformação de células vegetais. Um par semelhante de plasmídios complementares, cada um contendo os genes quer do T-DNA da octopina, quer da onc, foi construído por A. Hoekema et al. (1983) Nature 303:179-180.

Chilton et al. (18 de janeiro de 1983) 15th Miami Winter Symp., também relataram a construção de um plasmídeo "micro-Ti" feito por meio da ressecção do mini-Ti com SmaI para cancelar praticamente todo o T-DNA excepto o gene da sintase da nopalina e os limites esquerdo e direito. O micro-Ti foi inserido num plasmídeo pRK290 modificado que carecia do seu locus SmaI, e foi empregue de maneira similar à do mini-Ti, com resultados comparáveis.

O objecto do presente invento é conferir as plantas resistência a pragas, especificamente resistência a insectos. Na busca deste objectivo, outros objectos são inserir



de maneira estável uma codificação genética de uma proteína insecticida no genoma da célula vegetal, fazer com que esse gene seja expresso nos tecidos vegetais, que a expressão seja ou regulada, ou constitutiva, e que os tecidos vegetais estejam numa planta normal. Outro objectivo é proporcionar novos tecidos insecticidas especializados numa planta, em particular um meio para produzir, num dicotiledonea normal, um bugalho que contenha um tecido insecticida dentro de seu próprio tecido. Outros objectivos e vantagens tornar-se-ão evidentes pela descrição que segue.

O invento divulgado na presente memória descritiva proporciona uma planta que compreende uma célula vegetal geneticamente modificada com um gene estrutural insecticida nela introduzido e expresso sob o control de um promotor expressável numa planta. Ademais, o invento proporciona tecido vegetal compreendendo uma célula vegetal cujo genoma inclui T-DNA, que contém um gene estrutural insecticida inserido numa tal orientação e espaçamento em relação a um promotor expressável numa planta, que seja expressável na planta sob o controle daquele promotor. São também proporcionadas novas estirpes de bactérias contendo e replicando T-DNA, conforme definido na presente, sendo o T-DNA modificado para conter um gene estrutural insecticida inserido com tal orientação e espaçamento em relação a um promotor expressável na planta, que seja expressavel numa célula vegetal sob o controlo do citado promotor. Além disso o invento proporciona novos plasmídios com a capacidade de se replicarem no E. coli e compreendendo T-DNA, e possuindo, além disso um gene estrutural insecticida inserido no T-DNA contido no plasmidio de tal maneira que seja expressável numa célula vegetal sob o controle de um promotor expressável na planta. Adicionalmente, este invento divulga novos plasmídios nos quais o gene estrutural insecticida é passível de expressão em E. coli ou Bacillus subtilis, e divulga também estirpes de bactérias que obrigam os citados plasmídios de expressão



bacteriana.

O presente invento compreende um gene estrutural insecticida sob o controlo de um promotor expressável em células vegetais, sendo a citada combinação de gene/promotor inserida numa célula vegetal por quaisquer meios conhecidos da técnica. Mais especificamente na realização preferida, o invento divulgado na presente memória compreende, além disso a expressão, em células vegetais, de um gene estrutural insecticida sob o controlo de um promotor expressável em plantas, após a introdução através do T-DNA, ou seja, pela inserção do gene estrutural insecticida no T-DNA sob o controlo de um promotor expressável em plantas e a introdução do T-DNA contendo a inserção, numa célula vegetal, por métodos conhecidos.

O invento serve para modificar geneticamente células vegetais e plantas inteiras pela inserção de genes estruturais insecticidas úteis a partir de várias espécies ou estirpes bacterianas. Tais genes estruturais insecticidas úteis incluem sem a eles se limitarem os genes que codificam proteínas insecticidas conforme definido abaixo, especialmente a proteína cristalina do Bacillus thuringiensis proteínas relacionadas, e similares. O invento é exemplificado pela introdução e expressão de um gene estrutural de uma proteína cristalina de B. thuringiensis var Kurstaki HD-73 nas células vegetais de algodão ou tabaco. Uma vez que sejam obtidas células vegetais expressando um gene estrutural insecticida sob o controlo de um promotor expressável na planta, tecidos vegetais e plantas inteiras podem ser regeneradas a partir do mesmo usando métodos e técnicas bem conhecidos na técnica. As plantas regeneradas são então reproduzidas por meios convencionais e os genes introduzidos podem ser transferidos a outras estirpes cultivadas por técnicas conhecidas de cultivo de plantas.

A introdução e expressão do gene estrutural de uma pro



teína insecticida pode ser usada para proteger uma safra contra a infestação por larvas de insectos tais como o "hornworm" (Manduca sp.) ou a broca do milho (Ostrinnia nubilalis). Outros usos do invento explorando as propriedades de outros genes estruturais insecticidas introduzidos noutras espécies de plantas, tornar-se-ão claramente visíveis aos especialistas na arte. O invento aplica-se, em principio, a qualquer introdução de um gene estrutural insecticida em qualquer espécie de planta, na qual DNA estranho (T-DNA na realização preferida) possa ser introduzido e em que o citado DNA possa permanecer estávelmente replicado. De modo geral essas classes incluem, sem porém se limitarem a elas, plantas gimnospermas e dicotiledonias tais como girassol (família Compositae), tabaco (família Solanaceae), alfafa, soja e outros legumes (família Leguminosae), algodão (família Malvaceae) e a maioria das verduras. As pragas que podem ser controladas por meio do presente invento e as safras que podem ser protegidas contra as mesmas incluem, sem porém estarem limitadas a elas as relacionadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Devido à sua susceptibilidade a um certo número de larvas, o algodão é uma escolha ideal para a inserção de um gene de proteína insecticida. Cada uma das que seguem é uma grande praga do algodão e é também susceptível à proteína insecticida do B.thuringiensis: Heliothis zea (lagarta do algodão), Pectinophora gossypiella (lagarta rosa), Heliothis virescens (lagarta do broto de tabaco), Trichoplusia ni (lagarta da couve). A aplicação de proteína insecticida preparada a partir de B. thuringiensis esporulante não controla no campo insectos tais como a lagarta rosa devido aos seus ciclos vitais e hábitos de alimentação particulares. Uma planta que contenha proteína insecticida nos seus tecidos controlará este recalcitrante tipo de insecto, proporcionando assim uma vantagem sobre os usos insecticidas anteriores do B.thuringiensis. Pela incorporação da proteína insecticida nos tecidos de



uma planta, o presente invento proporciona uma vantagem adicional sobre tais utilizações da técnica anterior, ao eliminar os casos de aplicação não uniforme e os custos de compra e aplicação de preparados insecticidas no campo. Ademais, o presente invento elimina a necessidade da temporização cuidadosa de tais preparados, visto que as larvas pequenas são as mais sensíveis á proteína insecticida e a proteína está sempre presente, reduzido ao mínimo os danos ás safras, que de outro modo resultariam do ataque larval antes da aplicação.

A figura 1 apresenta a sequência do gene de proteína cristalina de p123/58-10, descrito no Exemplo 1.

A figura 2 apresenta um mapa de posições de restrição e transcrição do T-DNA de pT115955.

A figura 3 é um diagrama de uma construção descrita no Exemplo 2, de um vector de DNA recombinante transportando um gene estrutural insectida sob o controlo de um promotor expressável na planta.

As definições que seguem são proporcionadas para afastar ambiguidades quanto à intenção do seu uso na especificação e reivindicações.

T-DNA: Um segmento de DNA derivado do princípio indutor de transformação (TIP) que se integra no genoma da planta. O termo, conforme é <sup>usado</sup> na presente descrição inclui DNA originalmente derivado de qualquer estirpe de Agrobacterium indutora de tumor, incluindo A. tumefaciens e A. rhizogenes, sendo o segmento inserido deste último algumas vezes denominado, na técnica anterior, por R-DNA. Além disso o termo T-DNA, conforme é usado aqui inclui quaisquer alterações, modificações, mutações, substituições, inserções e cancelamentos sejam naturais sejam introduzidos por técnicas de laboratório, sendo uma necessidade e limitação estrutural prin



principal de tais modificações que esteja presente o suficiente das extremidades direita e esquerda dos T-DNAs para assegurar a esperada função, de integração estável no genoma da célula vegetal transformada, que é característica do T-DNA. O T-DNA pode, por si só ser um composto de segmentos derivados de uma pluralidade de fontes de ocorrência natural ou sintética. Além disso o T-DNA deve conter pelo menos um promotor expressável na planta na posição 5' ou "a montante" do local de inserção do gene estrutural insecticida, de forma suficientemente completa para controlar o início da transcrição e o início da translação de um gene estrutural insecticida inserido. Este promotor pode ser derivado de um gene de T-DNA, um gene de planta, ou qualquer outro gene com um promotor que seja funcional dentro de uma célula vegetal em pelo menos um tecido e pelo menos um estágio de desenvolvimento. Preferivelmente, será proporcionado um ponto de inserção "a jusante", na direcção de transcrição e translação iniciada pelo promotor (3' para o promotor localizado de tal modo em relação ao promotor que permita que um gene estrutural insecticida inserido no mesmo possa ser expresso sob o controlo do promotor, quer directamente quer como uma proteína de fusão. O T-DNA pode também incluir uma região 3' não traduzida a jusante do locus de inserção do gene estrutural insecticida, o qual pode funcionar para regular o término da transcrição, poliadenilação, e o processamento pós-transcritivo de DNA. Opcionalmente, uma proteína de fusão pode ser formada entre o gene estrutural insecticida e a extremidade 3' do gene estrutural que fornece a região 3' não traduzida. Os elementos do promotor e da região não traduzida 3' podem ser derivados dos mesmos ou de diferentes genes pré-existentes, e podem ser derivados da mesma planta ou de outra diferente, de T-DNA ou de outras fontes. Por exemplo, um gene estrutural insecticida, conforme exemplificado no presente, poderia estar instalado entre um promotor de gene vegetal e uma sequência 3' do mesmo gene, ou poderia ser uma construção com



preendendo a região não traduzida 3' de um gene e o promotor de outra, derivado da mesma ou de diferente espécie vegetal ou T-DNA. A região de codificação de um gene vegetal, conforme definida aqui pode incluir uma cópia cDNA da parte estrutural de um gene vegetal. As regiões do promotor e não traduzida 3' podem incluir modificações, quer de ocorrência natural quer artificialmente induzidas, e podem incluir segmentos sintetizados quimicamente.

Promotor vegetal: Conforme usado na presente memória inclui elementos reguladores, e pode além disso incluir elementos estruturais de um gene vegetal, os citados sendo elementos exógenos aos genes do próprio T-DNA. Estes incluem, sem a eles estarem limitados promotores dos genes de faseolina e a pequena sub-unidade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase. Ademais, um promotor de gene vegetal é uma região do gene que proporciona e pode regular o início da transcrição e o início da tradução. Adicionalmente, as sequências de gene estrutural vegetal (a região que codifica total ou parcialmente uma proteína e que pode ou não conter um ou mais "introns") podem ser introduzidos no T-DNA. (Um intron é uma região de uma transcrição de gene que é removida pós-transcritivamente antes do mRNA ser traduzido). A expressão sob o controle de um promotor vegetal pode assumir a forma de expressão directa, na qual o gene estrutural normalmente controlado pelo promotor é removido total ou parcialmente e substituído pelo gene estrutural insecticida inserido, sendo proporcionado um codon de partida quer como um resquício do gene estrutural vegetal quer como parte do gene estrutural insecticida inserido, ou por expressão de fusão de proteína, na qual todo ou parte do gene estrutural insecticida é inserido em fase de armação de leitura correcta dentro do gene estrutural vegetal existente. No último caso, o produto de expressão é denominado proteína de fusão. O segmento promotor pode ser, ele proprio, um composto de segmentos derivados de uma pluralidade de fontes de ocorrência natural ou sintética. As fontes de um promotor vegetal in-



cluem, não estando porém limitadas a elas as plantas relacionadas na Tabela 2.

Promotor de T-DNA: Refere-se a qualquer um dos promotores de ocorrência natural comumente associados ao T-DNA integrado. Estes incluem, não estando porém limitados a eles promotores da transcrição "1,6", genes de sintase de octópina (ocs), genes de sintase de nopalina (nos), genes de tms, tml, e tmr, e podem depender parcialmente da fonte TIP do T-DNA. A expressão sob controlo de um promotor de T-DNA pode assumir a forma de expressão directa, na qual o gene estrutural, normalmente controlado pelo promotor, é removido total ou parcialmente e substituído pelo gene estrutural insecticida inserido, um condon de partida sendo proporcionado quer como um resquício do gene estrutural de T-DNA, como parte do gene estrutural insecticida inserido, ou pela expressão de proteína de fusão, na qual todo ou parte do gene estrutural vegetal é inserido em fase de armação de leitura correcta dentro do gene estrutural de T-DNA existente. No último caso, o produto da expressão é denominado proteína de fusão. O segmento promotor pode, ele proprio, ser um composto de segmentos derivados de uma pluralidade de fontes, de ocorrência natural ou sintéticas.

Promotor expressável em Planta: Conforme é usado na presente descrição, inclui as definições de promotor de T-DNA e promotor vegetal, supra. Contudo, um aspecto essencial do promotor componente do presente invento é que o gene estrutural insecticida esteja sob o controlo de promotor expressável numa célula vegetal. Portanto, o promotor expressável na planta refere-se adicionalmente a qualquer promotor expressável numa célula vegetal, que seja expresso em pelo menos um tecido durante pelo menos um estágio de desenvolvimento. As fontes podem incluir, sem no entanto se limitarem a eles virus vegetais (por exemplo, os promotores das transcrições 35S e 19S do virus do mosaico da couve-flor, (CaMV), virus animais, eucariotas não vegetais (por exemplo,



animais, levedo), ou plastídios (por exemplo, um promotor de cloroplasto ou procariótico, se o gene insecticida tiver que ser inserido no DNA do cloroplasto). As propriedades e componentes de um promotor derivado de uma fonte que não seja um DNA ou T-DNA vegetal (por exemplo, "caixas TATA, pontos de partida translativos ATG, locais de emenda de introns, etc.) são as mesmas que as descritas supra para os promotores de T-DNA e promotores vegetais, e estão também incluídas dentro da presente definição. O segmento promotor pode, ele próprio, ser um composto de segmentos derivados de uma pluralidade de fontes de ocorrência natural ou sintética.

Gene estrutural insecticida: Conforme usado na presente descrição inclui a parte de um gene insecticida que compreende um DNA codificado duma proteína, um polipeptido insecticida ou parte do mesmo, possivelmente um codon inicial de tradução, carecendo porém de outros elementos funcionais de um gene bacteriano que regulam o início da transcrição e o início da tradução, comumente denominados região promotora. (Note-se que, no presente invento tais elementos funcionais bacterianos podem estar presentes após a transferência do gene estrutural insecticida dentro do T-DNA. Contudo, como eles não são funcionais dentro de uma célula vegetal, tais elementos não são mencionados pelo termo "gene estrutural insecticida"). Um gene estrutural insecticida pode ser derivado total ou parcialmente do DNA plasmídeo, DNA genómico cDNA e DNA quimicamente sintetizados. Pretende-se, ainda, que um gene estrutural insecticida possa conter uma ou mais modificações, quer nos segmentos de codificação quer nas regiões não traduzidas, que possam afectar a actividade biológica ou estrutura química do produto da expressão, a razão da expressão ou a maneira de controlar a expressão. Tais modificações poderiam incluir, sem porém a isso se limitarem mutações, inserções, cancelamentos, substituições, e modificações "silenciosas" que não alteram a estrutura



química do produto de expressão, mas que afectam a localização intercelular, transporte, excreção ou estabilidade do produto de expressão. O gene estrutural pode constituir uma sequência de codificação ininterrupta ou incluir um ou mais introns, vinculados pelas junções apropriadas de enlace "vegetal" funcional, que podem ser obtidas de uma fonte sintética ou de ocorrência natural. O gene estrutural pode ser um composto de segmentos derivados de uma pluralidade de fontes de ocorrência natural ou sintética, codificando uma proteína composta sendo a proteína composta insecticida ou parcialmente derivada de uma proteína insecticida.

Proteína insecticida: Conforme usado na presente descrição, inclui uma proteína bacteriana tóxica de qualquer modo aos insectos. Isto inclui uma proteína ou peptido que seja directa ou indirectamente tóxica ou inibidor de crescimento de insectos, sob quaisquer circunstâncias. Isto também inclui proteínas que são tóxicas quando do contacto, ingestão ou respiração, quer sozinhas quer em combinação com outro material, em qualquer ocasião dentro do ciclo vital de um insecto, incluindo os estágios de ova, larva, pupa, ninfa e adulto. Isto inclui proteínas tóxicas a insectos, especialmente os das famílias dos Lepidópteros e Dipteros, e os dos géneros Ostrinia, Heliothis, Pectinophora, e Trichoplusia, por exemplo, M. sexta, O. nubilalis, H. zea, H. virescens, P. gossypiella, I. ni. Outras classes que poderiam ser escolhidas como alvos incluem, sem porém se limitarem a elas relacionados na Tabela 1. Exemplos de proteínas insecticidas incluem, porém não estão limitados a diversas variedades, relacionadas na Tabela 3, de Bacillus thuringiensis ou de outras espécies de Bacillus, por exemplo, B. cereus, B. polilliae, e B. sphaericus. Os genes que são usados para construir ou de outro modo codificar sequências, codificando proteínas tóxicas aos insectos incluem, porém não estando limitados a fosfolipases, hialuronidases, fosfatases proteases, e as várias proteínas cristalinas de B. thuringiensis. O termo proteína cristalina deve ser enten-



dido como referindo-se a ambas as formas de protoxina e toxina, a proteínas tóxicas relacionadas com a proteína que é encontrada nos corpos de inclusão cristalinos do Bacillus thuringiensis, e às modificações artificiais de proteínas cristalinas de ocorrência natural. As proteínas relacionadas poderiam ser indentificadas por homologia de ácido nucleico, estrutural de proteína ou de sequência, reactividade cruzada imunológica, ou hibridização cruzada de ácidos nucleicos.

Tecido vegetal: Inclui os tecidos diferenciados e não diferenciados de plantas incluindo sem porém a eles se limitar as raízes, ramificações, pólen, sementes, tecido tumoral, tal como bugalho, e várias formas de agregações de células vegetais em culturas, tais como embriões e calos. O tecido vegetal pode ser in planta ou em órgão ou tecido ou cultura de células, e pode ser derivado de plantas que incluem, mas não estão limitadas, a elas as relacionadas na Tabela 2

Célula vegetal: Conforme usado no presente, inclui células vegetais in planta e células vegetais e protoplastos em cultura, e pode ser derivado de plantas que incluem, mas sem se limitarem a elas às relacionadas na Tabela 2.

A produção de uma planta geneticamente modificada expressando um gene estrutural insecticida introduzido via T-DNA combina os ensinamentos específicos da presente divulgação com uma variedade de técnicas e expedientes conhecidos da técnica. Na maioria dos casos, existem expedientes alternativos para cada estágio do processo geral. A escolha de expedientes depende de variáveis tais como a escolha do TIP básico ou outros sistemas vectores para a introdução e manutenção estável do gene estrutural insecticida expressável, a espécie de planta a ser modificada e a estratégia de regeneração desejada, e o gene estrutural insecticida particular a ser usado, que apresentem todos estágios



de processo alternativos que os possuidores de habilidade comum podem selecionar e usar para alcançar um resultado desejável. Por exemplo, apesar do facto de o ponto de partida para obter um gene estrutural insecticida estar exemplificado no presente pedido por DNA isolado de B. thuringiensis var. Kurstaki HD-73, o DNA de outras estirpes bacterianas transportando genes de proteína insecticida ou moléculas de DNA recombinante poderiam ser usados em sua substituição desde que fossem feitas modificações apropriadas nos processos de isolamento e manipulação de genes á medida em que novos meios sejam desenvolvidos para a expressão controlada e/ou a inserção estável de genes estranhos em células vegetais, os peritos do ramo estarão aptos a escolher dentre esses estágios de processo alternativos para atingir um resultado desejado. Os aspectos fundamentais do invento são a natureza e a estrutura do gene insecticida e seus meios de inserção e expressão num genoma vegetal. Os estágios restantes da incorporação preferida, para obter uma planta geneticamente modificada, incluem a inserção da combinação de promotor/gene estrutural insecticida no T-DNA, transferir o T-DNA modificado para uma célula vegetal onde o T-DNA modificado se torna parte do genoma da célula vegetal, técnicas para a cultura in vitro e eventual regeneração em plantas integrais, que podem incluir estágios de selecionar e detectar células vegetais transformadas e estágios de transferência do gene introduzido desde a estirpe originalmente transformada, em cultivos comercialmente aceitáveis.

Uma característica principal do presente invento na sua forma de realização preferida é a construção de T-DNA com um gene estrutural insecticida inserido sob o controlo de um promotor expressável em planta, ou, mais preferivelmente, um promotor de T-DNA, conforme estes termos foram definidos, supra. O gene estrutural insecticida deve ser inserido em posição e orientação correctas em relação ao promotor desejado. A posição possui dois aspectos. O primeiro



relaciona-se com qual o lado do promotor em que está inserido o gene estrutural. Sabe-se que a maioria dos promotores controla o início da transcrição e tradução em apenas uma direcção ao longo do DNA. A região de DNA que permanece sob o controlo do promotor é denominada como estando "a jusante" ou, alternativamente, "atrás" ou "3'" quanto ao promotor. Portanto, para ser controlado pelo promotor, a posição correcta de inserção do gene estrutural vegetal deve ser "a jusante" do promotor. (Reconhece-se que alguns promotores conhecidos exercem controle bidireccional, caso em que qualquer lado do promotor poderia ser considerado como estando "a jusante" do mesmo). O segundo aspecto de posição refere-se à distância, em pares de base, entre os elementos funcionais conhecidos do promotor, por exemplo, o local de início de transcrição, e o local de início de translação do gene estrutural. Uma substancial variação parece existir em relação a esta distância, de promotor para promotor. Portanto, as exigências estruturais em relação a isso são melhor descritas em termos funcionais. Como uma primeira aproximação, uma razoável operacionalidade pode ser obtida quando a distância entre o promotor e o gene estrutural insecticida inserido é semelhante à distância entre o promotor e o gene de T-DNA que ele normalmente controla. A orientação refere-se à direccionalidade do gene estrutural. A parte do gene estrutural que finalmente codifica o término de amino da proteína vegetal é denominado a extremidade 5' do gene estrutural, ao passo que a extremidade que codifica os aminoácidos próximos da extremidade carboxilo da proteína é denominada a extremidade 3' do gene estrutural. A orientação correcta do gene estrutural insecticida é com a extremidade 5' do mesmo próximo do promotor. Uma exigência adicional no caso de construções que levam à expressão de proteína de fusão é que a inserção do gene estrutural insecticida na sequência de gene estrutural doado por promotor seja tal que as sequências de codificação dos dois genes estejam na mesma fase de armação de leitura, uma exigên



cia estrutural que é bem entendida na técnica. Uma exceção a esta exigência, de importancia para o presente invento dá-se no caso de um "intron" separar sequências de codificação derivadas de um gene de proteína insecticida do primeiro segmento de codificação do gene estrutural insecticida. Nesse caso, o gene estrutural insecticida deve ser dotado de um locus de união compatível com a junção de união a montante proporcionada pelas sequências de codificação não insecticidas a os loci de união de posicionados de modo tal que a armação de leitura correcta para o gene estrutural doado pelo promotor e o gene estrutural insecticida sejam restaurados em fase após o "intron" ser removido pelo processamento pós-transcritivo. Diferenças em razões de expressão ou controlo de desenvolvimento podem ser observadas quando um dado gene estrutural insecticida é inserido sob o controlo de diferentes promotores expressáveis em plantas. Diferentes propriedades incluindo, porém não se limitando a elas propriedades tais como estabilidade, localização intercelular ou intracelular ou excreção, solubilidade, especificidade de alvo, e outras propriedades funcionais da própria proteína expressa podem ser observadas no caso de proteínas de fusão que dependem do lugar de inserção, o comprimento e propriedades do segmento de proteína de T-DNA incluído dentro da proteína de fusão e as interações mútuas entre os componentes da proteína de fusão que efectuam a configuração dobrada da mesma, que apresentam todas numerosas oportunidades para manipular e controlar as propriedades funcionais do produto de proteína insecticida, dependendo das desejadas propriedades fisiológicas dentro da célula vegetal, tecido vegetal, e na planta integral.

A localização do locus de inserção da combinação promotor/gene estrutural insecticida não é crítica, contanto que a função de transferência de sequências envolvendo imediatamente os limites do T-DNA não seja interrompida, visto que, por estudos da técnica anterior, essas regiões parecem ser essenciais para a inserção do T-DNA modificado no genoma da



planta. Os loci de inserção preferidos são aqueles que existem em áreas que são as mais activamente transcritas, em particular o gene tml e uma área designada "1,6" existente no fragmento H indIII-f, e equivalente à transcrição 24, conforme mostrado na figura 2. O termo "1,6" é usado aqui para designar esta região activamente transcrita do T-DNA. O T-DNA no qual a combinação de promotor/gene insectida é inserida, é obtido de qualquer um dos plasmidio TIP. O gene insectida é inserido por técnicas padrão bem conhecidas dos especialistas na arte. A orientação do gene vegetal inserido, em relação à direcção de transcrição e translação dos genes T-DNA endógenos, não é crítica e qualquer uma das duas orientações possíveis é funcional. Diferenças na razão de expressão podem ser observadas quando um dado gene é inserido em diferentes localizações dentro do T-DNA, possivelmente devido a factores tais como a metilação do DNA e a estrutura da cromatina. Níveis rapidamente detectáveis de expressão de um promotor vegetal do gene de faseolina têm sido obtidos onde aquele gene foi inserido em pTil5955, um plasmidio do tipo octopina de A. tumefaciens num local SmaI encontrado dentro do gene tml ou um local HpaI encontrado dentro de tmr.

Um meio conveniente para inserir uma combinação de promotor/gene estrutural insectida no T-DNA envolve o uso de um vector de transporte, conforme descrito supra, tendo segmentos de DNA (os segmentos entre os quais se deseja a inserção) incorporado num plasmidio capaz de replicar-se em E. coli. O segmento de T-DNA contém um locus de restrição, preferivelmente um que seja singular dentro do vector de transporte. O gene estrutural insectida pode ser inserido no locus singular nas sequências de T-DNA e o vector de transporte é transferido para dentro de células da estirpe apropriada de Agrobacterium, preferivelmente uma cujo T-DNA seja homólogo aos segmentos de T-DNA do vector de transporte. A estirpe transformada de Agrobacterium é,



preferivelmente cultivada em condições que permitam a seleção de um resultado de recombinação homólogo duplo que resulte na substituição de um segmento pré-existente do plasmídeo Ti por um segmento de T-DNA do vector de transporte. Contudo, deve-se notar que o presente invento não se limita à introdução da combinação de promotor/gene estrutural insecticida no T-DNA por um mecanismo de recombinação homólogo duplo; um resultado de recombinação homólogo com um vector de transporte (talvez exista apenas uma só região contínua de homologia com o T-DNA) em um único local ou uma inserção de um promotor transposos bacteriano portador de gene também demonstrará ser um meio eficaz para inserir a combinação no T-DNA.

Seguindo a estratégia acima descrita, o T-DNA modificado pode ser transferido para células vegetais por qualquer técnica conhecida no ramo. Por exemplo, esta transferência pode realizar-se da maneira mais conveniente, seja pela infecção directa de plantas com a nova estirpe de Agrobacterium contendo um gene insecticida incorporado ao T-DNA, seja pela co-cultivação da estirpe de Agrobacterium com células vegetais. A primeira técnica, de infecção directa, resulta, oportunamente no aparecimento duma massa tumoral ou bugalho no local de infecção. As células de bugalho podem subsequentemente ser reproduzidas em cultura e, em circunstâncias apropriadas conhecidas dos peritos do ramo regeneradas em plantas integrais que contém o segmento de T-DNA inserido. Usando o método de co-cultivação, uma certa proporção das células vegetais é transformada, ou seja, terão T-DNA transferido nas mesmas e inserido no genoma celular da planta. Em qualquer dos casos, as células transformadas devem ser seleccionadas ou separadas para distingui-las das células não transformadas. A selecção é mais rapidamente realizada proporcionando-se um marcador seleccionável incorporado no T-DNA em adição ao gene estrutural insecticida. Os exemplos incluem a redutase de dihidrofo-



lato ou a fosfotransferase de neomicina expressa sob o controle de um promotor da sintase da nopalina. Esses marcadores são seleccionados pelo crescimento num meio contendo respectivamente metotrexato ou Kanamicina, ou seus análogos. Ademais, o T-DNA proporciona marcadores endógenos tais como o gene ou genes que controlam o crescimento independente de hormonas dos tumores provocados pela Ti em cultura o gene ou genes que controlam a morfologia anormal de raízes tumorais induzidas pelo Ri, e os genes que controlam a resistência a compostos tóxicos tais como análogos de aminoácido, sendo essa resistência proporcionada por uma sintase de opina. Os métodos de separação bem conhecidos dos especialistas do ramo incluem ensaios quanto à produção de opina, hibridização para sequências características de RNA ou T-DNA, ou ensaios imunológicos para proteínas específicas, incluindo ELISAs (acrónimo para "ensaio de luzimas imuno-absorventes encadeadas ensaios rádio imunes e borrões "western". Adicionalmente, as propriedades tóxicas da proteína insectida expressa podem ser usadas para identificar o tecido transformado.

Uma alternativa à estratégia do vector de transporte envolve o uso de plasmídios que compreendem T-DNA ou T-DNA modificado, no qual é inserido um gene estrutural insecticida, sendo os citados plasmídios capazes de replicação independente numa estirpe de Agrobacterium. Provas recentes revistas no Histórico indicam que o T-DNA de tais plasmídios pode ser transferido de uma estirpe de Agrobacterium para uma célula vegetal, contanto que a estirpe de Agrobacterium contenha certos genes de transactuação cuja função é promover a transferência de T-DNA para uma célula vegetal. Os plasmídios que contêm T-DNA e são capazes de se replicar independentemente numa estirpe de Agrobacterium são aqui denominados plasmídios "sub-TIP". É possível um espectro de variações nas quais os plasmídios sub-TIP diferem na quantidade de T-DNA que contêm. Uma extremidade do espec-

tro retém todo o T-DNA do plasmidio TIP e é algumas vezes denominada plasmidio "mini-TIP". Na outra extremidade do espectro, é cancelada toda menos a quantidade mínima de DNA que envolve o limite do T-DNA, sendo as partes restantes o mínimo necessário para serem transferíveis para e integráveis na célula hospedeira. Tais plasmídios são denominados "micro-TIP". Os plasmídios sub-TIP são vantajosos pelo facto de serem pequenos e relativamente fáceis de manipular directamente, eliminando a necessidade de transferir o gene para o T-DNA a partir de um vector de transporte, através de recombinação homóloga. Depois do gene estrutural desejado ter sido inserido, eles podem ser introduzidos directamente numa célula vegetal contendo os genes de trans-actuação que promovem a transferência do T-DNA. A introdução numa estirpe de Agrobacterium é convenientemente realizada quer por transformação da estirpe de Agrobacterium, quer pela transferência conjunta de uma célula bacteriana doadora, para o que as técnicas são bem conhecidas de qualquer técnica. Para fins de introdução de novas sequências de DNA num genoma de planta, os plasmídios TIP e os plasmídios mini-TIP devem ser considerados funcionalmente equivalentes.

Apesar da forma de realização preferida deste invento incorporar um sistema em que se utiliza como meio o Agrobacterium baseado em T-DNA para a incorporação do gene insecticida no genoma da planta que deve ser tornada resistente aos insectos, outros meios para transferir e incorporar o gene estão também incluídos no âmbito deste invento. Outros meios para a incorporação estável do gene insecticida num genoma de planta incluem, não estando porém limitados a eles, o uso de vectores baseados em genomas virais, mini-cromossomas, transposons, e recombinação homóloga ou não homóloga em cromossomas de plantas. Formas alternativas de aplicação desses vectores numa célula vegetal incluem também não estando porém limitadas a elas a absorção directa de de ácido nucléico, fusão com lipossomas contendo o vector,



micro-injecção, e encapsulação em proteína da capa virótica, seguida de um processo semelhante á infecção. Os sistemas baseados em células de Agrobacterium e TIPS podem ser usados para transformar dicotiledóneas e gimnospérmicas pela transferência de DNA duma bactéria para uma célula vegetal; sistemas baseados em vectores alternativos ou meios para a aplicação de vectores podem ser usados para transformar todas as gimnospérmicas e todas as angiospérmicas incluindo tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.

A regeneração de células e tecidos transformados é realizada recorrendo-se a técnicas conhecidas. Um objecto da fase de regeneração é obter uma planta completa que cresça e se reproduza normalmente, mas que retenha o T-DNA integrado. As técnicas de regeneração variam um pouco de acordo com princípios conhecidos da técnica, dependendo da origem do T-DNA, da natureza de quaisquer modificações no mesmo, e da espécie de planta transformada. As células vegetais transformadas por um T-DNA do tipo Ri são rapidamente regeneradas, utilizando-se técnicas bem conhecidas de qualquer técnico do ramo sem experimentação indevida. As células vegetais transformadas por T-DNA do tipo Ti podem ser regeneradas, em alguns casos, pela adequada manipulação dos níveis hormonais na cultura. Preferivelmente, contudo, o tecido transformado por Ti é mais facilmente regenerado se o T-DNA tiver sido transformado num ou ambos os genes tmr e tms. A inactivação desses genes devolve ao normal o equilíbrio hormonal no tecido transformado e aumenta grandemente a facilidade e a manipulação dos níveis de hormónio na cultura, levando a uma planta que é facilmente regenerada devido à sua fisiologia hormonal mais normal. É importante notar que se as mutações em tmr e tms forem introduzidas no T-DNA através de recombinação homóloga dupla com um vector de transporte, a incorporação das mutações deve ser seleccionada de maneira diferente da incorporação do promotor/gene estrutural insecticida. Por exemplo, no primeiro ca-



so poder-se-ia seleccionar para resistência ao cloranfenicol, ao passo que a última selecção poderia ser para resistência à kanamicina. A inactivação dos loci tms e tmr poderia ser realizada por uma inserção supressão, ou substituição de um ou mais nucleótidos dentro das regiões de codificação ou promotoras desses genes, sendo a mutação projectada para inactivar o promotor ou interromper a estrutura da proteína. (A construção de mutações adequadas foi exemplificada por T. C. Hall et al., números de série 485.613 e 485.614). Nalguns casos, as células tumorais são capazes de regenerar ramificações que contém T-DNA integrado e expressam genes de T-DNA, tais como a sintase de nopalina, e que também expressam um gene estrutural insecticida inserido. As ramificações podem ser mantidas vegetativamente por enxerto em plantas arraigadas e podem desenvolver flores férteis. As ramificações servem assim como material vegetal genitor para plantas de progénie normal que contém o T-DNA e expressam do o gene estrutural insecticida inserido nas mesmas.

O genotipo do tecido vegetal transformado é frequentemente escolhido pela facilidade com que as suas células podem crescer e regenerar-se na cultura in vitro. Caso uma cultura de interesse agronomico seja inadequada para essas manipulações, uma variedade mais sensível é primeiramente transformada. Após a regeneração, o gene de proteína insecticida estranho recém-introduzido é facilmente transferido para o cultivo agronomico desejado através de técnicas bem conhecidas dos especialistas na arte de cultivo de plantas e genética vegetal. Os cruzamentos sexuais de plantas cultivadas com as culturas agronomicas resultaram num híbrido inicial. Esses híbridos podem então voltar a cruzar-se com plantas possuidoras do fundo genético desejado. A progénie é continuamente examinada e seleccionada quanto à presença contínua do T-DNA integrado ou quanto a um novo fenotipo resultante da expressão do gene de proteína insecticida inse-



rido. Desta maneira, após um certo número de ciclos de cruzamento de retorno e selecção, podem-se produzir plantas com um genotipo idêntico aos pais agronomicamente desejados, com o acréscimo do gene de proteína insecticida inserido.

Num método alternativo para conferir a uma safra a resistência a insectos, pode-se infectar as plantas dentro de um campo que deva ser protegido com uma célula de Agrobacterium abrigando um plasmidio TIP tendo T-DNA não incapacitado que contenha um gene de proteína insecticida expressável. Verificámos que as larvas se alimentarão com o tecido dos bugalhos. Quando as larvas de insectos que infestam o campo se alimentarem de tecido transformado contendo um gene insecticida, serão afectadas pela proteína insecticida existente naquele tecido. O Agrobacterium e o TIP poderiam ainda codificar genes de atraentes de insectos. A presença de tais atraentes no tecido transformado aumentará a preferência dos insectos por tal tecido como fonte de alimentação, relativamente ao resto do material de safra no campo.

#### EXEMPLOS

Os Exemplos que seguem utilizam muitas técnicas bem conhecidas e acessíveis aos especialistas nos ramos de biologia molecular e manipulação de TIPS e Agrobacterium; tais métodos estão totalmente descritos numa ou mais das referências, citadas quando não descritos detalhadamente na presente descrição. As enzimas são obtidas de fontes comerciais e utilizadas de acordo com as recomendações do fornecedor ou outras variantes conhecidas da técnica. Os reagentes, tampões e condições de cultura são também conhecidas dos técnicos do ramo. Trabalhos de referência contendo tais técnicas padrão incluem os seguintes: R. Wu, ed. (1979) Meth. Enzymol. 68, R. Wu et al, eds (1983) Meth. Enzymol. 100 e 101, L. Grossman & K. Moldave, eds. (1980) Meth. Enzymol.



65, J. H. Miller (1972) Experiments in Molecular Genetics, R. Davis et al. (1980) Advanced Bacterial Genetics, R. F. Schleif & P. C. Wensink (1982) Practical Methods in Molecular Biology, e T. Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning. Adicionalmente, R. F. Lathe et al. (1983) Genet. Engin. 4: 1-56, fazem comentários úteis sobre manipulações de DNA.

O uso textual isolado do nome de uma endonuclease de restrição, por exemplo "BclI" refere-se ao uso daquela enzima numa digestão enzimática, excepto num diagrama onde o mesmo se possa referir ao locus de uma sequência susceptível à acção daquela enzima, por exemplo, um locus de restrição. No texto, os loci de restrição são indicados pelo uso adicional da palavra "locus" por exemplo, locus BclI. Uso adicional da palavra "fragmento", por exemplo, "fragmento BclI", indica uma molécula linear de DNA com entrançado duplo, com extremidades geradas pela acção da enzima mencionada (por exemplo, um fragmento de restrição). Uma frase como "fragmento BclI/SmaI" indica que o fragmento de restrição foi gerado pela acção de duas diferentes enzimas, aqui BclI e SmaI, resultando as duas extremidades da acção de diferentes enzimas. Note-se que as extremidades terão as características de serem "rombudas" ou "aderentes" (isto é, terão uma protuberância de um só cordão passível de acoplamento de base com um oligonucleótido complementar de cordão único), e que a sequência de uma extremidade aderente será determinada pela especificidade da enzima que a produz.

Nestes exemplos, são usados símbolos especiais para tornar as sequências mais facilmente compreensíveis. As sequências que codificam proteína estão sublinhadas, e os codons estão separados por barras (/). As posições de seccionamentos ou espaçamentos em cada cordão, causados por endonucleases de restrição ou de outro modo, são indicadas pela colocação de asteriscos (\*).

Os plasmídios, e sómente os plasmídios, são precedidos



de um "p", por exemplo, pTil5955 ou pKS-4, e a estirpe com parênteses indica um plasmídeo abrigado na mesma, por exemplo, A. tumefaciens (1Til5955) ou k802(pKS-4). A Tabela 4 provê um índice útil para identificar plasmídios e seus inter-relacionamentos. A Tabela 5 fornece uma relação de estirpes depositadas.

### Exemplo 1

O primeiro estágio no desenvolvimento de uma safra resistente a insectos foi clonar o gene de proteína insecticida do B. thuringiensis var. Kurstaki HD-73, que está depositado junto à Coleção de Culturas de Pesquisa Agrícola (Agricultural Research Culture Collection), no Northern Regional Research Laboratory, em Peoria, IL., e tem o número NRRL B-4488.

#### 1.1 Clonagem do gene de proteína insecticida do Bacillus thuringiensis.

O plasmídeo de 50 megadaltons (MD) foi enriquecido a partir do HD-72 por meio de centrifugação com gradiente de sacarose. Foi construída uma biblioteca de HD73 digerindo-se primeiramente este plasmídeo com HindIII. Os fragmentos resultantes foram misturados a, e ligados com pBR322 linearizado com HindIII (F. Bolivar et al. (1978) Gene 2:95-113) e transformado em E. coli HB101. Os transformadores resistentes à ampicilina e sensíveis à tetracilina foram separados pela digestão do DNA isolado do plasmídeo com HindIII e escolhendo-se os clones com inserções de pares de 6,6 quilobases (kbp). As colônias contendo os plasmídios p123/58-3 e p123/58-10 foram selecionadas dentre a biblioteca de HD-73 para análise subsequente, usando um ensaio biológico com insectos (vide Exemplo 8). Esses clones foram alimentados em caldo L e uma suspensão de células numa concentração de 250 vezes foi precipitada com ultra-sons



e o extrato, aplicado à superfície da dieta dos insectos. Larvas recém-nascidas de Manduca sexta (larva do tabaco) foram colocadas sobre a dieta durante uma semana. As larvas de insectos alimentadas com extractos de estirpes contendo o p123/58-3 ou o p123/58-10 não cresceram e todas as larvas morreram em 2 a 5 dias. Não houve diferença aparente entre as larvas alimentadas com esses extractos e as alimentadas com proteína insecticida purificada de células do B. thuringiensis.

A análise do enzima de restrição do p123/58-3 e p123/58-10 mostrou que os dois plasmídios eram idênticos excepto quanto ao facto de terem o fragmento de DNA de B. thuringiensis de 6,6 kbp inserido no vector pBR322 em orientações opostas. Note-se que ambos esses plasmídios podem ser convertidos um no outro pela digestão com HindIII, religação, e transformação em HB 101, seguido de estágios apropriados de selecção e separação.

O p123/58-10 foi ainda usado para sondar os transformantes na biblioteca de plasmídios HD-73. Dezasseis das 572 colónias hibridizaram-se na inserção do clone p123/58-10 e todas tinham o fragmento característico de HindIII de 6,6 kbp. Uma subsequente análise de enzima de restrição mostrou que esses clones eram todos de uma das duas possíveis orientações no pBR322 do mesmo fragmento de DNA. Isto sugeria que poderia haver um só gene de proteína cristalina na estirpe HD-73. O facto de que esses clones representam o único gene de proteína insecticida no HD-73 foi confirmado pela hibridização da sonda rotulada p123/58-10 com borrões Sulinos de DNA de plasmidio HD-73 digerido com HindIII, BgIII ou SallI. Nenhuma dessas enzimas tinha um locus de restrição em nosso gene de proteína cristalina clonado. Os resultados da hibridização mostraram um só cordão de DNA celular de B. thuringiensis hibridizado com p123/58-10 e indicaram ainda que o HD-73 possuía um só gene de proteína



cristalina insecticida. Identificámos um certo número de outros clones por hibridização com uma sonda feita de p123/58-10. O mapeamento de restrição mostrou que esses clones são todos idênticos quer ao p123/58-3 quer ao p123/58-10, apoiando ainda a conclusão de que o HD-73 possui um só gene de proteína cristalina.

### 1.2 Análise imunológica

As análises da proteína produzida por clones de E. coli mostram que a proteína codificada como p123/58-3 e p123/58-10, que formou uma faixa de precipitina com o antisoro da proteína insecticida do B. thuringiensis em placas de difusão de Ouchterlony. Os extractos de células foram analisados em geleias de SDS-poli-acrilamida a 10%, transferidos para nitrocelulose, e reações imunológicas feitas com anticorpo e proteína A 125 (Mancha Western, Exemplo 7). Nenhuma faixa foi encontrada a 130 kD (quilodalton, onde é observada a protoxina desnaturada, contudo, foi visto um peptido de cerca de 65 kD, o qual vincula o anticorpo da proteína cristalina (Manchas Western feitos como no Exemplo 7), e era de dimensão idêntica à da toxina activada. Este peptido representava aproximadamente 0,1% da proteína total do E. coli.

### 1.3 análise sequencial

Comparamos os nossos resultados sequenciais do DNA (figura 1), obtidos por métodos bem conhecidos dos especialistas técnica de sequenciamento de DNA (por exemplo, vide A. M. Maxam & W. Gilbert (1980) Meth. Enzymol. 65: 499-560), com sequências publicadas (vide Histórico). As sequências publicadas apresentavam apenas uma homologia parcial com nossa sequência. Foi observada uma moldura de leitura aberta de cerca de 2,8 kbp, que estava vinculada à extremidade 5' por um sinal de partida de expressão (ATG) e não parava até encontrar o local HindIII na junção entre o DNA do B.



thuringiensis e o vector pBR322. A dimensão da proteína codificada por esta moldura de leitura aberta do ATG até o local HindIII era maior que a da proteína de 67 KD que observamos estar expressamente no E. coli, porém menor do que é necessário para codificar a proteína cristalina nativa de 130 KD. O facto de o meio exacto de término da expressão no peptido de leitura, codificado em pBR 322 não ser importante é sugerido pela verificação de que a actividade insecticida era codificada pelas inserções de DNA do B. thuringiensis com qualquer uma das duas orientações dentro do vector pBR322. Presumivelmente os resíduos de aminoácido carboxi-terminais inicialmente trasladados para o término carboxi final do polipeptido expresso foram removidos no E coli por um processo proteolítico semelhante ao que activa naturalmente a proteína cristalina.

### Exemplo 2

Este exemplo indica a inserção do gene insecticida do Bacillus thuringiensis entre um promotor de gene de T-DNA e um sinal de poliadenilação (acréscimo poli (A)), a transferência do gene insecticida a várias espécies vegetais através de um plasmidio Ti, e a regeneração de plantas que expressam este gene sob o controlo do promotor de T-DNA. Uma grande parte da estratégia usada nesta construção está diagramada na figura 3, que representa de maneira esquemática plasmídios e não esta necessariamente desenhada em escala.

#### 2.1 Introdução do locus BamHI no gene de proteína insecticida.

Um locus BamHI é introduzida no gene de proteína insecticida do pl23/58-10 num locus logo 5' da partida da sequência de codificação. A sequência de base de tipo selvagem (b) e as bases alteradas num activador de oligonucleótido (a) são como segue:



BamHI

- a) 5' AGATGGAG\*GATCCTT ATG GAT AAC AAT 3'  
b) ...AGATGGAG GTAACTT/ATG/GAT/AAC/...  
Met Asp Asn Asn

As bases alteradas são a sequência ATG sublinhada em (a). Note-se que são asseguradas boas propriedades de hibridização, porque apenas três dentre 27 pares de bases são alterados.

O pl23/58-10 é digerido com HindIII e é misturado com, e ligado a DNA mWB2344 RF (forma replicante) linearizado com HindIII. A mistura transformada em JM103 e as colónias transformadas são separadas por isolamento de plasmídeo, seguido de análise de restrição quanto á presença da inserção de uma única cópia do fragmento contendo gene de proteína insecticida. Os vectores que contém as duas possíveis orientações são rotulados M13-Bt-A e M13-S. Eles contém os cordões em contra sentido e em sentido directo respectivamente, do gene estrutural insecticida quando na forma virótica.

O M13-BtA é hibridizado com o activador oligonucleótido, 5' AGATGGAGGATCCTTATGGATAACAAT3', previamente sintetizado conforme descrito no Exemplo 10.1. O oligonucleótido:M13-Bt-A híbrido é incubado com o fragmento Klenow da polimerase I de DNA do E. coli, o DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) é enriquecido, e a mistura é transformada em MJ103. Os "virions" produzidos pelos transformantes são isolados e usados para infeccionar células a uma baixa multiplicidade de infecção. O DNA RF é isolado dentre um número de colónias infectadas e é caracterizado por mapeamento de restrição. Os clones derivados do mutante oligonucleótido-cordão activado são identificados pela presença de um novo locus BamHI na extremidade 5' do gene estrutural insecticida, e um tal vector é denominado M13-





ne de T-DNA p403 (que codifica o gene "1,6" que foi descrito na Descrição Detalhada, transcrição 24 na figura 2, vide também C.F.Fink(1982), tese de Mestrado em Ciências, Universidade de Wisconsin-Madison), é digerido com ClaI e então religado. (Alternativamente, estas mesmas manipulações descritas aqui podem ser realizadas directamente no p403, que é um clone baseado em pBR322, substituindo a tetraciclina pela ampicilina durante a selecção). A mistura de ligação é transformada em E. coli K802 (W. B. Wood (1966) J. Mol. Biol. 16:118) e seleccionada para resistência á tetraciclina. Os plasmídios são isolados fazendo "minipreparados" (preparados de plasmidio de culturas de células de pequeno volume) e obtém-se mapas de restrição para se provar a estrutura. O novo veículo, pKS-proI (vide T. C. Hall et al., pedido dos E.U.A. Nº de série 485.614), pode ser linearizado por ClaI.

O pKS-proI desenvolvido em K802 foi seccionado com ClaI misturado com, e ligado a um conector BamHI/ClaI que não tinha 5'-fosfato, 5'CGGATC3'. A mistura resultante foi digerida com ClaI para remover o pKS-proI religado, e transformada em K802. Os plasmídios dos transformantes resistentes á tetraciclina são separados por análise de restrição e um plasmidio com o locus ClaI na partida de translação ATG substituída por uma locus BamHI é denominado pKS-proI (Bam).

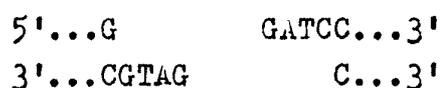
### 2.3 Introdução de um Gene Resistente á Kanamicina no pKS-proI(Bam).

É vantajoso ter um gene de resistência á kanamicina (Kan) inserido peoximo da combinação de promotor/gene insecticida, de modo a permitir a selecção de recombinantes duplos homólogos após um acasalamento triplo. A fonte do Kan foi o pKS-4 (Exemplo 2,5). No pKS-4 o gene Kan é flanqueado em cada lado por uma locus ClaI. Para remover um gene Kan contendo fragmento de pKS-4 com ClaI (isto é num frag-



mento "ClaI/Kan"), é necessário introduzir uma ClaI naquele plasmídeo, no lado oposto ao Kan partindo do locus ClaI existente. Isso é realizado convertendo-se uma BamHI convenientemente colocada (5'...G\*GATCC...3') á especificidade de ClaI (5' ...AT\*CGAT...3').

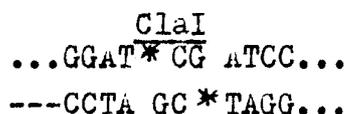
O pKS-4 é linearizado por digestão com BamHI, gerando assim extremidades aderentes com as seguintes estruturas:



As extremidades reentrantes desta estrutura são preenchidas por incubação com o fragmento Klenow da polimerase I do DNA de E. coli, formando as seguintes extremidades rombudas:



Quando essas extremidades estiverem rombudas e ligadas umas ás outras, a sutura resultante possui a seguinte sequência:



Note-se que a estrutura resultante é susceptível á acção do ClaI mas não á acção do BamHI.

Alternativamente á construção acima, pode-se converter o locus BamH, ou outro locus de restrição convenientemente localizado, num locus ClaI pelo uso dos conectores apropriados. O pKS-4 foi digerido com SmaI, misturado com e ligado a ClaI/ conectores de extremidade rombuda com a



sequência 5' CATCGATG3', digerido com ClaI, religado, e transformado em K802. Os plasmídios isolados de transformantes resistentes á Kanamicina foram examinados quanto á presença de uma novo locus ClaI na posição anteriormente ocupada por um locus posição SmaI. Um fragmento ClaI/Kan pode ser isolado de tal plasmidio.

Quando desenvolvido no E. coli K802, o pKS-proI(Bam) é metilado em dois loci ClaI restantes: um está a cerca de 145 bases da junção de poliadenilação do promotor (isto é cerca de 30 bases além do segundo locus de adenilação), o outro está a cerca de 200 bases da locus direita de p403 EcoRI (Vide figura 2). A metilação bloqueia o seccionamento pela endonuclease de restrição ClaI num locus de outro modo susceptível. Portanto, essas metilações protegem esses locais e efectivamente dirigem a acção da enzima ClaI para outros loci. O pKS-pro(Bam) é transferido para e desenvolvido no E. coli GM33, uma estirpe que não metila resíduos de adenosina no DNA, de modo que as loci ClaI, de outro modo metilados podem ser seccionados. Após a purificação desse plasmidio do GM33 (pKS-pro(Bam), é realizada uma digestão parcial com ClaI e a mistura resultante é ligada ao fragmento ClaI/Kan descrito acima. Após a transformação em E. coli K802, os transformantes são seleccionados em meios contendo tetraciclina e kanamicina. Após o isolamento do plasmidio e o mapeamento de restrição é identificado um clone com a construção desejada e o plasmidio encontrado neste clone é rotulado como p11-83a (figura 3).

O p11-83a possui um fragmento que contém gene kan, ligado na locus ClaI "mediana" cerca de 30 bp além do segundo locus posição de poliadenilação. O fragmento BamHI do gene insecticida, isolado do vector modificado construído no Exemplo 2.1, é agora ligado na posição BamHI do p11-83a linearizado com BamHI que foi transferido para e desenvolvido no K802 e é metilado. Após transformação em K802, se-

55.710

Ref:384116



lecção por tetraciclina e kanamicina, isolamento do plasmídeo e mapeamento da enzima de restrição, a construção desejada com o gene estrutural insecticida inserido entre o promotor "1,6" pT115955 e o locus de poliadenilação é identificada, e o plasmídeo abrigado na mesma é rotulado p11-83b (figura 3).

#### 2.4 Introdução do p11-83b nos plasmídios T1

O p11-836 é introduzido no pT115955, pT1A66 (equivalente a pT115955, mas com um gene tms não funcional), e os mutantes são cancelados em regeneração que afecta os genes, através de recombinação homóloga (Exemplo 10). As plantas de tabaco são transformadas por um sistema descrito no Exemplo 6, e os transformantes são identificados por borções Southern e Northern (técnicas bem conhecidas dos especialistas do ramo), com sondas apropriadas e pela presença de octopina e proteína cristalina. O tecido de tabaco transformado é letal às larvas do tabaco. As plantas de tabaco são regeneradas de células transformadas, conforme descrito no Exemplo 6, e admitidas em programas de cultivo. Os campos de plantas regeneradas e seus descendentes que contém proteína insecticida são resistentes á infestação por lavras de insectos tais como as larvas do tabaco, em virtude do efeito tóxico sofrido por tais larvas ao alimentarem-se do tecido de tais plantas.

#### 2.5 Clonagem e isolamento de um gene de resistência á kanamicina.

O pkz102 (R. A. Jorgenson et al. (1979) Mol Gen. Genet. 177:65-72), um plasmídeo ColeI que contém uma cópia do "transposon" Tn5, foi digerido com BamHI e HindIII, misturado com pBR322 anteriormente linearizado com as mesmas duas enzimas, ligado, e transformado em k802. Os plasmídios, isolados de transformantes seleccionados para resistência tanto à ampicilina como a kanamicina, foram mapeados quan-



to á restrição e um, tendo a estrutura mostrada na figura 3, foi rotulado pKS-4.

### Exemplo 3

Este exemplo ensina outro método para inserir um gene expressável para a proteína insecticida do B. thuringiensis num genoma de planta. O vector de transporte é semelhante ao usado por C. L. Fink (1982), tese de Mestrado em Ciências, Universidade de Wisconsin-Madison, para colocar, o gene nos num plasmidio T1 de octopina. No presente invento, as sequências de codificação de proteína para nos são removidas e substituídas por um gene insecticida antes da inserção no plasmidio T1. O resultado eventual é um plasmidio T1 tipo octopina contendo um gene insecticida expressável em células vegetais sob o controle de um promotor da sintase da nopalina.

#### 3.1 Movimentação do gene nos para o interior do M13mp7

O pCF44 (Fink, supra) foi digerido com XhoI, religado a si próprio, e transformado de novo em k802. O DNA do plasmidio isolado de transformantes resistentes á ampicilina foi analisado com enzimas de restrição. Um plasmidio com um único ponto XhoI dentro das suas sequências de DNA derivadas de plasmidio T1 foi denominado pCF44A. A única posição XhoI foi o resultado do cancelamento de um fragmento de DNA entre as duas posições pCF44 XhoI. A expressão deste fragmento XhoI resultou na completa remoção de dois loci ClaI inconvenientes.

O pCF44A foi digerido com HindIII e BamHI, misturado com e ligado ao pBR322, que havia sido digerido com as mesmas duas enzimas de restrição e transformado em k802. Os transformantes resistentes á amp icilina foram seleccionados e examinados por análise de enzima de restrição do DNA



de plasmídeo e foi identificada uma colónia que continha um plasmídeo tendo o gene nos, rotulado pNS5.-

O pNS5 foi digerido com EclI e BamHI e foi misturado com e ligado a uma forma replicante circular de cordão duplo (RF) do vector de DNA de cordão único M13mp7, que havia sido linearizado com BamHI. Após a transformação da mistura em JM103 e a selecção de placas brancas, foram identificadas duas colónias por mapeamento de restrição após isolamento de RF, denominadas M13-1 e M13-3, que continha os cordões nos sentidos directo e retrógrado respectivamente, quando em forma de cordão único.

### 3.2 Colocação do locus NcoI atrás do promotor nos

Um activador oligonucleótido tendo a sequência 5' AGTCTCATACTCACTCTCAATCCAAATAATCTGCCATGGAT3' foi sintetizado conforme descrito no Exemplo 10.1. Este oligonucleótido foi alterado na base sublinhada na sequência de ocorrência natural, na extremidade 5' do gene estrutural nos. A alteração resultou na introdução de uma posição NcoI, 5'...C\*CATGG...3', no início de translação do ATG do gene nos. O oligonucleótido foi hibridizado ao DNA M13-3 circular de cordão único isolado de "virions" que haviam sido removidos do meio de cultura por sedimentação. O oligonucleótido M13-3 híbrido foi incubado com ligase de DNA e o fragmento Klenow da polimerase I do DNA de E. coli, DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) foi enriquecido, e a mistura foi transformada em JM103. Os "virions" produzidos pelos transformantes foram isolados e usados para infectar células a uma baixa multiplicidade de infecção. O DNA de RF foi isolado de um certo número dessas colónias infectadas e caracterizado por mapeamento de restrição. Os clones derivados do cordão activado com oligonucleótido mutante foram identificados pela presença de uma única posição NcoI, o que permitia aos mesmos serem linearizados por aquela enzima. Os clones <sup>mutados</sup>/foram ainda caracterizados para localizar



o locus NcoI pela digestão com ClaI, BamHI (para identificar moléculas linearizadas), e ClaI juntamente com NcoI. O vector M13-3 mutado foi denominado M13-3A/B18a

### 3.3 Movimentação do gene insecticida para o interior de M13mp8

O gene pl23/58-10 (Exemplo 1.1) foi digerido com EcoRI e misturado com, e ligado ao DNA de RF M13mp8 linearizado com EcoRI. Após a transformação da mistura em JM103 e a selecção das placas brancas, duas colónias tendo o fragmento portador do gene insecticida inserido em orientações opostas foram identificadas por mapeamento de restrição. Elas foram rotuladas MBT14 e MBT3 e tinham, respectivamente, os cordões em sentido directo e retrógrado quando em forma de cordão único.

### 3.4 Colocação de um locus NcoI no início da translação do gene insecticida

Um activador oligonucleótido com a sequência 5' GAGGTAACCCATGGATAACAAT3' é sintetizado como descrito no Exemplo 10.1. Este oligonucleótido é alterado nas duas bases sublinhadas a partir da sequência de ocorrência natural na extremidade 5' do gene estrutural insecticida. A alteração resulta na introdução de um locus NcoI, 5'... C\*CATGG...3', no início da translação de ATG do gene insecticida. O oligonucleótido é hibridizado em DNA MBT3 circular de cordão único isolado de virions que haviam sido removidos do meio de cultura por sedimentação. O híbrido oligonucleótido: MBT3 é incubado com ligase de DNA e o fragmento Klenow da polimerase II do DNA do E. coli, ccDNA, é enriquecido, e a mistura é transformada em JM103. Os "virions" produzidos pelos transformantes são isolados e usados para infectar células a uma baixa multiplicidade de infecção. O DNA de RF é isolado de um certo número dessas colónias infectadas e caracterizado por mapeamento de restri-



ção os clones derivados do cordão activado por oligonucleótido são identificados pela presença de um único locus NcoI que permite aos mesmos ser linearizados por aquela enzima. O clone mutado é caracterizado, além disso por análise de enzima de restrição e a presença da sequência do mutante é confirmada por sequenciamento. O plasmidio com a sequência desejada é rotulado MBT3 (Nco).

### 3.5 Montagem de um gene insecticida expressável em planta num vector de transporte.

O DNA do RF de MBT3(Nco) digerido com NcoI e HindIII é misturado com, e ligado a um conector, sintetizado conforme descrito no Exemplo 11.1, tendo a seguinte estrutura: extremidade HindIII BamHI

5' AGCTGACTAACTAG3'

3'CTGATTGATCCTAT5'

Este conector codifica os codons de paragem (sublinhados) em todas as três fases de leitura, e é terminado por um locus BamHI funcional e uma extremidade adesiva compatível com HindIII e incapaz de reconstruir um locus HindIII. O fragmento de DNA portador do gene insecticida é então aparado por digestão com NcoI e BamHI e é isolado por eletroforese em gel de agarose.

O pKS111-N (Fink, supra) é um plasmidio com um gene nos inserido no DNA Tn5 (de pKS-4), que tem um gene kan funcional, que está ele proprio, inserido no T-DNA do pKS111-N. O pKS111-N é linearizado com SstII e digerido até o fim com BamHI. O M13-3A/B18a é digerido com NcoI e SstII e o fragmento promotor SstII/NcoI é isolado por eletroforese de gel de agarose. O promotor SstII/NcoI e os fragmentos de gene NcoI/BamHI são misturados com, e ligados aos produtos de reacção pKS111-N SstII/BamHI. A mistura de ligação é então transferida para o interior de E. coli k802. O plasmidio isolado de transformantes resistentes á kanamicina e à te



traciclina é submetido á análise de enzima de restrição e são identificadas as colónias contendo plasmídios idênticos ao pKS111-N, excepto pela substituição de uma parte 5' do gene nos com um gene estrutural insecticida. Tal plasmídeo é denominado pKS111-NpBt.

### 3.6 Inserção dentro de plasmídios TIP, infecção de planta e regeneração.

O E. coli k802 (pKS111-NpBt) é acasalado com A. tumefaciens conforme descrito no Exemplo 9. As estirpes de Agrobacterium escolhidas abrigam plasmídios TIP, baseados em pT115955, contendo mutações, tais como as descritas no Histórico, que facilitam a regeneração. Recombinantes homólogos são escolhidos conforme descrito no Exemplo 9 e caracterizados por mapeamento de restrição. A eficácia da construção é rapidamente testada pela infecção de hastes de girassol. Os bugalhos resultantes são ensaiados por ELISA e borrões Western conforme descrito no Exemplo 7, e por análise biológica, conforme descrito no Exemplo 8. De acordo com o descrito no Exemplo 6, as estirpes de Agrobacterium são usadas para infectar células de tabaco que são então regeneradas. As plantas resultantes são usadas como material reprodutor a ser cruzado com diversas variedades comerciais, para as quais se desejam propriedades de resistência a insectos. As plantas regeneradas e os campos dos seus descendentes que contém proteína insecticida são resistentes à infestação por lavras de insectos tais como a larva do tabaco, em virtude do efeito tóxico sofrido por tais lavras ao alimentarem-se de tecido de tais plantas.

#### Exemplo 4.

Este exemplo ensina outro método de inserção de um gene expressável da proteína insecticida do B. thuringiensis num genoma de planta. A estratégia é semelhante á descrita no Exemplo 3, mas difere pelo facto de ser usado um promotor vegetal ao invés de um promotor de T-DNA. O gene vege-



tal que fornece o promotor é a faseolina, que tem demonstrado ser activa em espécies diferentes da sua origem, o feijão Phaseolus vulgaris L.

#### 4.1 Mudança do gene faseolina para o interior do M13mp7

Conectores BamHI, tendo a sequência 5' GGATCC3', são temperados para formar estruturas de cordão duplo, e ligados em extremidade rombuda para formar concatenadores. Estes concatâmeros são parcialmente digeridos com BamHI para expor as extremidades adesivas 5'GATC...3', que são compatíveis com as extremidades adesivas geradas pelas enzimas BamHI, BclI, BglIII, MboI, Sau3AI, e XhoII (5'GATC...3'). um clone de faseolina 177.4 fagócito de Charon 24A (S. M. Sum et al. (1981) Nature 289:37-41, J. L. Slighton et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1897-1901, também designado como AG-PVPh177.4) é digerido com BglIII e BamHI, misturado com e ligado aos conectores concatenados, e completamente digerido com BamHI, para aparar os conectores e expor as extremidades adesivas BamHI, um fragmento de 3,8 kbp contendo o gene da faseolina e sequências laterais 5' e 3' é isolado por eletroforese de gel de agarose seguido de eluição. Este fragmento possui loci BamHI em qualquer uma das duas extremidades, visto que o local de conexão BamHI/BglIII não é suscetível à acção de qualquer uma das enzimas. O fragmento de BglIII/BamHI de 3,8 kbp pode também ser obtido de p8.8, um sub-clone de 177.4 baseado em pBR322.

O fragmento de 3,8 kbp é misturado com e ligado ao M13mp7 RF linearizado com BamHI. Após a transformação da mistura em JM103 e a selecção de placas brancas, são seleccionadas duas colónias após a caracterização por análise de restrição e hibridização dos RFs e do DNA fagócito. As formas virais do M13-3,8A e M13-3,8S demonstram conter respectivamente, dos cordões de sentido retrogrado e directo do ge da faseolina.



#### 4.2 Colocação do locus NcoI atrás do promotor de faseolina

O Dna do Phaseolus do M13-3,8A possui uma posição NcoI cerca de 450 bp a montante da partida de transcrição da faseolina. A presença deste locus será inconveniente quando se desejar clivar o plasmídeo no NcoI para que seja introduzido no início de transcrição da faseolina. O DNA de RF do M13-3,7A isolado é linearizado com NcoI e as extremidades salientes 5' são preenchidas pelo fragmento Klenow da polimerase I do DNA do E. coli. Após ligação da extremidade rombuda e transformação em JM103, os DNAs de RF são isolados e caracterizados por mapeamento de restrição. É escolhida uma colónia que abrigue um vector, denominado M13-3,8Ac, que carece do locus NcoI do DNA do Phaseolus, mas que de outro modo fica inalterado em relação ao M13-d, 8A.

Um activador oligonucleótido com a sequência 5' ATACTACTCTACCATGGTGAGAGCAAGGG3' é alterado nas bases sublinhadas em relação à sequência de ocorrência natural na extremidade 5' do gene da faseolina. O oligonucleótido é hibridizado com DNA de M13-d,8Ac de cordão único circular isolado de "virions" que haviam sido removidos do meio de cultura através de sedimentação. O híbrido oligonucleótido: M13-3,8Ac é incubado com ligase de DNA e o fragmento klenow de polimerase I de DNA do E. coli, cccDNA é enriquecido, e a mistura é transformada em JM103. Os "virions" produzidos pelos transformantes são isolados e usados para infectar células a uma baixa multiplicidade de infecção. O DNA de RF é isolado dentre um certo número dessas colónias infectadas e caracterizado por mapeamento de restrição. Os clones derivados do cordão mutante activado por oligonucleótido são identificados pela presença de um novo locus NcoI posicionado na extremidade 5' da sequência de codificação. Os clones são, além disso caracterizados para localizar o locus NcoI por digestão com ClaI e ClaI juntamente com NcoI. O vector M13-3,9Ac é rotulado M13-3,8Aa.



#### 4.3 Colocação de um locus HindIII na extremidade 3' do gene da faseolina.

Para introduzir convenientemente o gene insecticida no gene da faseolina, duas alterações adicionais devem ser feitas naquele gene da faseolina. A primeira alteração envolve a adição do locus HindIII (5'...A\*AGCTT...3') 5' ao locus de poliadenilação próximo da extremidade 3' do gene de faseolina. A outra alteração importante envolve a colocação de paragem de translação (por exemplo, TAA, TAG, ou TGA, sublinhados abaixo) em todas as três molduras de leitura. Quando o oligonucleótido

5'AGGGTGCATTTGAAGCTTGAATAAGTAAGAACTAAAATGC3' (a) é comparado com a extremidade 3' da sequência de codificação do gene de faseolina (b), pode-se ver que o mesmo tem as propriedades desejadas, como segue:

#### HindIII

a) 5'AGGGTGCATTTGA\*AGCTTGAATAAGTAAGAACTAAAATGC3'

b) ...AGGGTGCATTTGT GTACTGAATAAGTATGAACTAAAATGC...  
 não coincidência: ↑ ↑↑↑ ↑

Note-se também que este 38-mero tem apenas 6 não coincidências, assegurando assim boas propriedades de hibridização durante a activação. O oligonucleótido 5'AGGGTGCATTTGAAGCTTGAATAAGTAAGAACTAAAATGC3', sintetizado como descrito no Exemplo 10.1, é hibridizado em DNA de M13-3.8Aa circular de cordão único purificado de virions isolados pela centrifugação do meio de cultura. O híbrido de oligonucleótido/M13-3.8Aa é incubado com ligase de DNA e o fragmento klenow de polimerase I de DNA de E. coli, cccDNA é enriquecido, e a mistura é transformada em JM103. Os virions produzidos pelos transformantes são isolados para infeccionar células a uma baixa multiplicidade de infecção. O DNA de RF é isolado dentre um certo número das colónias infectadas e caracterizado por análise de enzima de res



trição. Os clones derivados do cordão mutante ativado por oligonucleótido são identificados pela presença de um traçado de locus HindIII na extremidade 3' do gene da faseolina, e a presença de sequências mutantes em ambas as extremidades do gene estrutural é confirmada por sequenciamento. Um vector contendo as desejadas sequências é rotulado como M13-3.8Ab.

#### 4.4 Inserção do gene insecticida

O DNA de RF de MBT3(Nco) é digerido com NcoI e HindIII e é misturado com, e ligado ao DNA de M13-3.8Ab digerido com NcoI e HindIII. A mistura é transformada em K802 e o DNA de plasmídeo de transformantes resistentes à Kanamicina e/ou tetraciclina é isolado e caracterizado por análise de enzima de restrição. Um plasmídeo tendo o gene estrutural insecticida inserido entre o promotor de faseolina e o local de poliadenilação é rotulado M13PpBt, e é escolhida uma colônia abrigando o mesmo.

#### 4.5 Mudança do gene de faseolina modificado para dentro de um vector de transporte.

O pKS111-K (Fink, supra) possui o gene kan Tn5 do pKS-4 inserido entre os locais HindIII do T-DNA do pKS111. O DNA de RF/M13-PpBt é digerido com BamHI e misturado com, e ligado ao pKS111-k linearizado com BamHI (Fink, supra). Os plasmídios de transformantes de k802 resistentes à kanamicina e/ou à tetraciclina são isolados e caracterizados por traçado de restrição. É escolhida uma colônia que abrigue um plasmídeo rotulado pKS111-PpBt, que contém a combinação de promotor de faseolina/gene estrutural insecticida/ /local de poliadenilação, que, juntamente com um gene Kan, é envolvido por T-DNA de octopina.

#### 4.6 Inserção dentro de plasmídios TIP, infecção da planta, e regeneração.



O E. coli K802 (pKS111-PpBt) é acasalado com A. tumefaciens conforme descrito no Exemplo 9. As estirpes de Agrobacterium escolhidas abrigam plasmídios TIP, baseados em pT115955, contendo mutações, tais como as descritas no Histórico, que facilitam a regeneração. Recombinantes homólogos são seleccionados conforme descrito no Exemplo 9 e caracterizados por mapeamento de restrição. A eficácia da construção é rapidamente testada pela infecção de hastes de girassol. Os bigalhos resultantes são ensaiados por ELISA e borões Western, como é descrito no Exemplo 7 e por ensaio biológico, como se descreve no Exemplo 8. Conforme descrito no Exemplo 6, as estirpes de Agrobacterium são usadas para infectar células de tabaco que são então regeneradas. As plantas resultantes são usadas como material de criação para serem cruzadas com diversas variedades comerciais, para as quais se desejam propriedades de resistência a insectos. Os campos de plantas regeneradas e seus descendentes contendo proteína insecticida são resistentes à infestação por larvas de insectos tais como a larva do tabaco, em virtude do efeito tóxico sofrido por tais larvas ao alimentarem-se com o tecido de tais plantas.

### Exemplo 5

Neste Exemplo a regeneração envolve tumores da cenoura despertados por plasmídios TIP baseados em Ri e é efectuada essencialmente conforme é descrita por M-D. Chilton et al. (1982) Nature 295:432-434.

#### 5.1 Infecção com raiz fibrosa

Discos de cenoura são inoculados com cerca de  $10^9$  bactérias em 0,1 ml de água. São cortados segmentos de um a 1,5 cm das extremidades das raízes obtidas, colocadas em meio Monier sólido (1-1,5% agar) carente de hormonas (D. A. Tepfer & J. C. Tempe (1981) Cr. hebdom. Seanc. Acad. Sci., Paris 295:153-156), e desenvolvidos entre 25 C e 27 C no escu-

55.710

Ref:384116

ro. As culturas não contaminadas por bactérias são transferidas a cada 2 a 3 semanas e são sub-cultivadas em meio Monier sem hormônios nem agar. As raízes transformadas podem ser reconhecidas pela sua morfologia aberrante e selecionadas .

### 5.2 Regeneração de raízes em plantas

O tecido de raízes cultivado descrito no Exemplo 5.1 é colocado em meio Monier solidificado (0,8% agar) suplementado com 0,3  $\mu$ M 2,4-D e 0,72mM de cinetina. Após 4 semanas, o tecido calosso resultante é colocado em meio Monier líquido sem hormonas. Durante a incubação a 22-25°C num agitador (150 r. p. m. ) durante um mês, o calo dissocia-se numa cultura em suspensão da qual se diferenciam embriões que, quando colocados em discos de Petri contendo meio Monier desprovido hormônio, se desenvolvem em plantinhas. Essas plantinhas são desenvolvidas em cultura, e após "endurecimento" por exposição a atmosferas de humidade progressivamente decrescente, são transferidas para o solo, quer numa estufa quer num lote no campo.

### 5.3 O uso de vectores de raiz não fibrosa

Os vectores baseados em Ti que não têm genes tnr funcionais são usados em vez de vectores baseados em Ri, conforme descrito por T. C. Hall et al., pedidos dos EUA números de série 485.613 e 485.614. A construção de mutantes adequados pode ser feita pelos especialistas na arte, e é revista no Histórico.

### Exemplo 6

A regeneração deste Exemplo envolve tumores de tabaco incitados por um plasmidio TIP baseado em Ti e é essencialmente efectuada conforme descrito por K. A. Barton et al. (1983) Cell 32 :1033-1043.



### 6.1 Infecção com bugalho

O tecido de tabaco é transformado segundo uma abordagem que utiliza segmentos de haste invertidos, primeiramente descritos por A. C. Braun (1956) Canc. Res. 16:53-56. As superfícies das hastes esterilizadas com uma solução que era de 7% de Chlorox comercial e 80% de etanol, enxaguada com água destilada estéril, cortada em segmentos de 1 cm, colocada com a extremidade basal em discos de Petri contendo meio MS solidificado com agar (T. Murashige & F. Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15 : 473-497 ) desprovido de hormônios. A inoculação é efectuada perfurando-se a superfície basal cortada da haste com uma agulha de seringa e injectando bactérias. As hastes são cultivadas a 25°C com 16 horas de luz por dia. As calosidades que se desenvolvem são removidas da superfície superior dos segmentos de haste, colocados sobre meio MS solidificado contendo 0,2 mg/ml de carbenicilina e desprovidos de hormônios transferidos para meio fresco de MS-carbeniciclina, três vezes a intervalos de cerca de um mês, e testados para assegurar que as culturas estão livres de bactérias. Os tecidos axémicos são mantidos sobre meios MS solidificados desprovido de suplementos, sob as condições de cultura (25°C;16 h.:8h. luz/escuro) descritas acima.

### 6.2 Cultura de tecido transformado

Os clones são obtidos dos tecidos axémicos transformados conforme descrito por A. Binns & F. Meins (1979) *Planta* 145:365-369. As calosidades são convertidas em suspensões de células através de cultura em MS líquido tendo 0,02 mg/l de ácido acético de naftaleno (NAA a 25°C durante 2 ou 3 dias enquanto são agitados a 135 r.p.m., e filtrando-se alternadamente, através de malhas de aço de 543 e 213  $\mu$ m

O filtrado passado é concentrado, colocado em 5 ml de meio MS contendo 0,5% de agar derretido, 2,0 mg/l NAA, 0,3 mg/l de cinetina e 0,4 g/l de extracto de levedo Difco a uma den



sidade de cerca de  $8 \times 10^3$  células/ml. Quando as colónias alcançam um diâmetro de cerca de 1 mm são recolhidas à ponta de bisturi, colocadas sobre e cultivadas em meio MS tendo 2,0 mg/l NAA, 0,3 mg/l de quinolina e cerca de 10 ug/ml de S-(2-aminoetilo)-L-cisteína (AEC). (É tentada uma gama de concentrações de AEC, entre cerca de 2ug/ml e cerca de 30ug/ml, visto que a concentração eficaz exacta para a selecção dependerá da variedade de tabaco usada e das condições de crescimento às quais a planta de fonte e os tecidos derivados da mesma são submetidos). A AEC tem demonstrado ser um agente capaz de seleccionar tecido contendo sintase de octopina (G. A. Dahl & J. Tempé (1983) Theor. Appl. Genet., no prelo). Alternativamente, o filtrado é colocado a baixa densidade (várias centenas de células por ml) sobre um papel de filtro sobrepondo-se a uma camada de alimentação de células de tabaco crescendo sobre o meio de MS/NAA/quinolina/extracto de levedo. Quando colónias de 1 mm tiverem sido formadas, todo o papel de filtro é transferido para uma placa de Petri contendo o meio MS/NAA/quinolina/AEC solidificado. Os calos resultantes, que não apresentem o efeito de toxicidade pela AEC são seleccionadas, divididas em pedaços, e testadas quanto a outros fenótipos transformados tais como a produção de octopina e o crescimento independente de hormónio.

### 6.3 Regeneração de plantas

Os clones transformados são colocados sobre meio MS solidificado com 0,3 mg/l quinolina, e cultivados conforme descrito no Exemplo 6.1. As ramificações que se formam são enraizadas colocando-as num meio sólido (1,0% agar) contendo sais de meio MS com 1/10 de força, 0,4 mg/l de tiamina, cálcio de sacarose e hormónios, e tendo um pH de 7,0. As plantinhas arraigadas são desenvolvidas em cultura, endurecidas conforme descrito no Exemplo 5.2, e transferidas para

55.710

Ref:384116



o solo, quer numa estufa quer num lote no campo. As plantas são examinadas quanto à retenção dos fenótipos transformados por métodos bem conhecidos dos especialistas do ramo, tais como manchas Southern, Northern e de ponto com sondas apropriadas, ensaios de octopina, ensaios imunológicos (Vide Exemplo 7), ou biológicos (Exemplo 8) quanto à presença da proteína cristalina.

#### 6.4 Vectores usados

As construções descritas por T. C. Hall et al., pedidos dos EUA Números de série 485.613 e 485.614 são vectores baseados em Ti adequados, carecendo de genes tmr funcionais. O método descrito no Exemplo 6.1 para a infecção de segmentos de haste invertidos é frequentemente útil para o estabelecimento de linhas de células vegetais transformadas por TIP.

#### Exemplo 7

Um anticorpo de proteína anti-insecticida foi produzido por métodos bem conhecidos dos especialistas do ramo da imunologia. Manchas "Western", para detectar antígenos após electroforese com gel de SDS-poliacrilamida, foram feitos essencialmente conforme descrito por R. P. Legocki & D. P. S. Verma (1981) *Analyt. Biochem.* 111 :385-392.

Ensaio micro-ELISA (ensaio imuno-sorvente de enzima encadeada) são feitos utilizando-se placas tipo Immulon com 96 cavidades, através dos seguintes estágios:

#### 7.1 Vinculação do anticorpo às placas

No dia 1, as cavidades são revestidos com uma diluição a 1:1000 de anticorpo (proteína IgG anti-insecticida de coelho) em tampão de revestimento. 200,  $\mu$ l/cavidades são incubados a 37°C durante 2-4 horas. As placas são cobertas com Envoltório Saran durante esta incubação. Subsequentemente, as placas são enxaguadas três vezes com Tween salino



tamponado com fosfato (PBS-Tween) com uma espera de 5 minutos entre cada estágio de lavagem. Então é acrescentado albumina de serum com borina a 1% (BSA) ao enxaguamento e, após adição à cavidade e deixada em repouso durante 20 minutos antes de ser descartada. O enxaguamento é repetido mais cinco vezes com PBS-Tween.

### 7.2 Homogeneização do tecido

O tecido é cortado em pequenos pedaços e então homogeneizado com um politron usando 1 gm tecido/ml de Tween salino tamponado com fosfato-policivinilo pirrolidona-40 (PBS-Tween-2% PVP-40). Todas as amostras são mantidas em gelo antes e após a moagem e são obtidas curvas padrão. Uma curva padrão é obtida dos homogenatos de tecido e uma curva padrão é também obtida no tampão para se verificar a recuperação da proteína insecticida do tecido ou células homogenizadas. Após a centrifugação das células homogenizadas, 100ul de cada amostra são colocadas num furo e deixadas durante a noite a 40C. Para evitar erros, são feitas cópias de cada amostra durante a incubação. As placas são seladas.

### 7.3 Enzima de vinculação

Após a incubação durante a noite, o antígeno é descartado e as cavidades são lavadas cinco vezes com PBS-Tween esperando-se 5 minutos entre cada enxaguamento.

Um conjugado (proteína anti-insecticida IgG de coelho encadeada com fosfatase alcalina) é então diluído a 1:3000 no PBS-Tween-2% PVP contendo 0,2% de BSA e acrescentam-se a cada cavidade seguido de incubação durante 3-6 horas a 370C. Após a incubação, o conjugado é descartado e as cavidades são enxaguadas cinco vezes com PBS-Tween, esperando-se cinco minutos entre cada enxaguamento, como anteriormente.

### 7.4 Ensaio



Imediatamente antes de realizar o ensaio, um comprimido de 5 mg de fosfato de P-nitrojenito (obtido da Sigma e guardado congelado no escuro) é acrescentado, para cada 10 ml de substracto e centrifugado até que o comprimido seja dissolvido. 200 µl da solução à temperatura ambiente são rapidamente acrescentados a cada furo. A reacção é medida em vários tempos, por exemplo, t=0, 10, 20, 40, 60, 90, e 120 minutos, usando-se um leitor Dynatech Micro-ELISA. Quando o fosfato de p-nitrofenilo que é incolor, for hidrolizado pela fosfatase alcalina em fosfato inorgânico e p-nitrofenol, o último composto confere uma cor amarela à solução, que pode ser lida espectrofotometricamente a 410 nm.

#### Exemplo 8

Insectos de fontes comerciais foram obtidos e mantidos essencialmente conforme descrito por R. A. Bell & F. G. Joachim (1976) Ann. Entomol Soc. Amer. 69:365-373, ou R.T. Yamamoto (1969) J. Econ. Entomol. 62:1427-1431. Ensaio biológico de proteína insecticida foram realizados alimentando larvas de Manduca sexta com extractos daquela, virtualmente conforme descrito por J. H. Schesser et al. (1977) Appl. Environ. Microbiol. 33:878-880.

#### Exemplo 9

Acasalamentos triplos foram geralmente realizados conforme descrito abaixo; outras variações conhecidas dos especialistas do ramo são também aceitáveis. O E. coli k802 (vector de transporte baseado em pRK290) foi acasalado com E. coli (pRK2013) e um plasmidio TIP portador da estirpe cepa de A. tumefaciens resistente à estreptomicina. O pRK2013 foi transferido à estirpe levando o vector de transporte e mobilizou o vector de transporte para transferência ao Agrobacterium. O crescimento num meio contendo simultaneamente a estreptomicina e a medicação à qual o vector de transporte



é resistente, frequentemente kanamicina ou cloranfenicol, resultou na selecção de células de *Agrobacterium* com sequências do vector de transporte. Um acasalamento dessas células com *E. coli* (pPH1J1) resultou na transferência de pPH1J1 às células de *Agrobacterium*. Os vectores de transporte baseados em pPH1J1 e pRK290 não podem coexistir por muito tempo na mesma célula. O crescimento em gentamicina, à qual o pPH1J1 trás um gene de resistência, resultou na selecção de células que tinham perdido as sequências pRK290. As únicas células resistentes à estreptomicina, gentamicina, e kanamicina são aquelas que têm plasmídios T1 que foram submetidos a recombinação homologa dupla com o vector de transporte e agora são portadores da construção desejada. O pRK290 e o pRK2013 foram divulgados por G. Ditta *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7357, e o pPH1J1 por P. R. Hirsch (1978) Tese, Univ. E. Anglia.

#### Exemplo 10

Este exemplo descreve técnicas para a síntese e uso de oligonucleótidos sintéticos. Outras referências úteis podem ser encontradas na lista de trabalhos citados na secção introdutória a estes Exemplos.

#### 10.1 Síntese de oligonucleótidos

As técnicas de síntese química de fragmentos de DNA usadas nestes Exemplos utilizam um certo número de técnicas bem conhecidas dos especialistas do ramo da síntese do DNA. A modificação de nucleosídeos é descrita por H. Schaller *et al.* (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:3820, e H. Buchi & H. G. Khorana (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87:2990. A preparação de fosforamiditas de desoxi-nucleosídeos é descrita por S. L. Beaucage & M. H. Caruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859. A preparação da resina de fase sólida é descrita por S. P. Adams *et al.* (1983) J. Amer. Chem. Os processos



de hibridação úteis durante a formação de conectores sintéticos de cordão duplo estão descritos por J. J. Rossi et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:11070.

### 10.2 Uso dos Oligonucleótidos

O uso de oligonucleótidos sintéticos para reconstruir um segmento cancelado de um gene tem sido exemplificado por Hall et al., pedido dos EUA número de série 485.614. O uso de oligonucleótidos para conectar extremidades aderentes do local de restrição de outro modo incompatíveis tem sido exemplificado por Hall et al., pedido dos EUA número de série 485.614 e é bem conhecido dos especialistas na arte de manipulações de DNA recombinante.

### 10.3 Mutagenese dirigida por Oligonucleótidos

Métodos gerais de mutagenese dirigida foram revistos recentemente por D. Shortle et al. (1981) Ann. Rev. Genet. 15:265-294. De especial utilidade na manipulação de gene é a mutagenese dirigida por oligonucleótidos específica a uma posição revista recentemente por M. J. Zoller & M. Smith (1983) Meth. Enzymol. 100:468-500 e M. Smith & S. Gillam (1981) in Genetic Engineering; Principals and Methods; Vol. 3, eds: J. K. Setlow & A. Hollaender, e M. Smith (1982) Trends in Biochem. 7:440-442. Esta técnica permite a alteração de um ou mais pares de bases numa sequência de DNA ou a introdução de pequenas inserções ou cancelamentos. Exemplos recentes do uso da mutagenese dirigida por nucleótidos incluem M.J. Zoller & M. Smith (1983) supra, M. J. Zoller & M. Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10:6487-6500, G. Dalbaldie-McFarland et al. (1982) Proc. Acad. Sci. USA 79:6409-6413, G. F. M. Simons et al. (1982) Nucleic Acids Res. 10:821-832, e C. A. Hutchison III et al. (1978) J. Biol. Chem, 253:6551-6560. Vectores úteis baseados em M13 (por



exemplo, mWB2344) foram relatados por W. M. Barnes et al. (1983) Meth. Enzymol. 101:98-122, e W. M. Barnes & M. Bevan (1983) Nucleic Acids Res. 11:349-368.

A sequência a ser modificada é introduzida usualmente num vector bacteriófago de cordão simples, aqui um derivado de M10, por técnicas padrão bem conhecida dos que se dedicam ao ramo. O vector Dna está geralmente na forma replicante de cordão duplo (RF), visto que a forma viral de cordão único não pode ordinariamente ser "cortada e amarrada" por enzimas de restrição e ligases. Após a ligação in vitro do fragmento ao RF, transformação num hospedeiro adequado, e produção de DNA de cordão único (ssDNA) como parte do ciclo vital do vector. O ssDNA é isolado das partículas de bacteriófagos e hibridado com um oligonucleótido com suficiente comprimento e homologia de sequência para se hibridar ao vector na localização apropriada. O oligonucleótido deverá ter a sequência desejada como produto final e, outrossim, não diferir de modo algum da sequência a ser alterada.

Uma vez que seja formado um híbrido compreendendo um círculo de ssDNA ligado com base de pares ao oligonucleótido que contém a sequência mutante, o oligonucleótido activa a síntese de um cordão de DNA complementar pelo fragmento Klenow da polimerase I do DNA do E.coli, uma polimerase sem actividade de exonuclease 5'-a-3'. O vector é, opcionalmente, incubado com ligase de DNA e as reacções de polimerase e ligase podem ser feitas simultaneamente. Moléculas do DNA de cordão duplo circular (ccDNA), preferivelmente fechadas de maneira covalente, podem ser seleccionadas antes da transformação por técnicas que incluem centrifugação com gradiente de sacarose alcalina, extração com fenol sob condições alcalinas, e incubação com nucleasa S1. O vector pode agora ser transformado numa célula bacteriana hospedeira especial. As partículas de vírus desta infecção inicial são isoladas



e usadas para formar placas, infectando-se uma camada de bactérias. Nos casos em que se esteja mudando um locus de restrição, pode-se rapidamente examinar os RFs por análise de enzima de restrição. Pode-se também fazer separação por hibridação em condições cuidadosamente escolhidas, usando o ativador oligonucleótido mutante sintético como uma sonda, ou por sequenciamento de DNA. Quando um clone contendo a alteração desejada for isolado, pode-se manipular o novo DNA mutante conforme desejado, usando-se técnicas bem conhecidas dos especialistas.

Exemplo 11: Construção, transformação e expressão do gene insecticida

Para reconstruir um gene de protoxina completo, foram identificados locais de restrição de flanqueamento DNA por intermédio de borrões "Southern" de dissolução de restrição, uma técnica bem conhecida, e foram escolhidos clones de sobreposição de uma biblioteca PstI feita de 50 MD de DNA de plasmídeo enriquecido. As extremidades 5'- e 3'- do gene de protoxina foram, em seguida, fundidas em conjunto local único HindIII para formar um gene completo de protoxina, como será compreendido pelos peritos na arte, transportado por um plasmídeo denominado pBt73-16. O E. coli HB101 (pBt73-16) está depositado como NRRL B-15759.

O pKS-proI foi construído essencialmente conforme se descreveu no Exemplo 2.2. O DNA pKS-proI foi digerido com ClaI, preenchido com polimerase de DNA TH e ligado a um conector 5'CGGATCCG3', para formar o pKS-proI (Bam). O DNA pBR325 (F. Bolivar (1978) Gene 4:121-136) tendo crescido em E. coli GM48 (M.G. Marinus (1973) Molec. Gen. Genet. 127:47-55), foi digerido com Bcl I e BamH I, religado a si próprio, formando por isso um plasmídeo denominado pBR325~~AB~~, carente do fragmento Bcl I/BamHI de pBR325. Um fragmento de 4.2 Kbp EcoRI de pKS-proI (Bam), foi clonado no ponto



EcoRI do pBR325 a BB, formando assim um plasmídeo denominado p403B, que possui o T-DNA de pKS-proI(Bam) transferido do vector baseado em pRK 290 para um vector baseado em pBR325.

Em seguida o DNA pBT73-16 foi digerido com NdeI e as extremidades tornadas rombudas com polimerase de DNA de T4. O DNA Bacillus de extremidades rombudas foi misturado com e ligado a um DNA RF M13mpl9 de cordão duplo, linearizado-SmaI (J. Norrander et al. (1983) Gene 26: 101-106), formando um vector, denominado 1.6.4, possuindo um DNA Bacillus 3.6 kpb, de tal modo orientado que a forma de cordão simples era complementar à proteína cristalina mRNA (isto é, a fase que transporta o cordão de sentido retrógrado). Uma posição BamHI foi introduzido no interior do DNA Bacillus próximo de 5'-para a posição de partida translactiva da proteína cristalina, essencialmente conforme descrito no Exemplo 10, utilizando um local BamHI que continha activador de oligonucleótido com a extremidade 5'- do gene estrutural insecticida da sequência 5'GAGATGGAGGATCCTTATGGATAAC3, que resulta num vector denominado 1.6.4B-3.8.3. O gene estrutural de proteína insecticida pode ser removido do DNA RF 1.6.4B-3.8.3 de cordão duplo num fragmento BamHI de 3,75 kpb.

Os DNAs p 403B e 1.6.4B-3.8.3 digeridos com BamHI foram misturados um com o outro e ligados em conjunto, formando um plasmídeo, denominado p'03B/BTB/3, possuindo um comprimento total de gene estrutural de proteína insecticida, situado entre o promotor "1.6" e a posição de poliadenilação. A orientação desta construção resulta na síntese de proteína cristalina com o código mRNA quando transcrita do promotor "1.6".

O E. coli C 600 (pRK-203-kan-103-Lec), que está depositado como NRRL B-15821, é um derivado pRK290 que contém

as sequências T-DNA de pT115955 de entre os locais EcoRI nas posições 4,494 e 12, 823, conforme definido por R.F. Barker et al. (1983) Plant Mol. Biol. 2:335-350, excepto para a substituição de um gene kan derivado de Tn5 e um gene lectin para T-DNA entre o local de posição 5,512 HindIII e o local de posição 9,062 BamHI. O gene lectin é suprimido de pRK-203-kan-103-Lec por digestão com HindIII seguida de religação, que resulta num vector denominado pRK-203-kan-103. O pRK-203-kan-103 foi introduzido num ATCC15995 A. tumefaciens essencialmente conforme descrito no Exemplo 9. Identificou-se um duplo recombinante homólogo, denominado R32014, possuindo um T-DNA pT115955 modificado. Esta substituição suprime algumas sequências trn e tms, conforme referido na Descrição Preconceitualizada. O T-DNA R32014 transforma o tecido vegetal inoculado sem conferir o fenotipo de crescimento independente de hormonas. Os tecidos de tabaco transformados por derivados de R32014 podem ser regenerados em plantas normais utilizando registos bem conhecidos da técnica.

No Agrobacterium, os derivados pRR325 são "vectores suicidas" conforme descrito na Secção Histórico em Vectores Suicidas. Foram acasalados E. coli MC1061 (p403/BTB/3), E. coli (pRK2013) e A. tumefaciens. Foi isolada uma estirpe denominada R3-11, contendo células de A. tumefaciens que possuem p403/BTB/3 cointegradas em pT115955 trn<sup>-</sup>tms<sup>-</sup>, por meio de uma recombinação homóloga simples num lado da posição de poliadenilação, isto é, para a esquerda, do gene estrutural "1.6". (O gene "1.6" corresponde a ORF24 de Baker et al. supra).

Segmentos de hastes de Nicotiana tabacum var. Xanthi, foram inoculados com células de R3-11 essencialmente conforme descrito no Exemplo 6. Uma vez livres da bactéria de incitamento, os tecidos vegetais transformados são postos em



cultura, clonados com célula única e regenerados em plantas normais utilizando processos bem conhecidos da técnica da cultura de tecidos vegetais.

Larvas de tabaco alimentadas com tecido de calosidade de tabaco, que continha o comprimento total do gene de proteína insecticida expressável em vegetal foram observadas a revelar sintomas atribuíveis à toxicidade da proteína cristalina B. thuringiensis.

Borrões de "ponto" imunológicos análogos aos borrões "Western" (Exemplo 7) indicaram que o antigénio de proteína cristalina B. thuringiensis estava presente em extractos de tecido transformado contendo o comprimento total de gene da proteína insecticida expressável em vegetal.



TABELA 1

Insectos susceptiveis à proteina insecticida do B. thuringiensis

COLEOPTERA

Popillia japonica (besouro japonês)

Sitophilus granarius (lagarta do silo)

DIPTERA

Aedes aegypti ( mosquito da febre amarela)

A. atlanticus

A. cantans

A. cepsius

A. cinereus

A. communis

A. detritus

A. dorsalis

A. dupreei

A. menalimon

A. nigromaculis (mosquito da pastagem)

A. punctor

A. sierrensis (mosquito de ãco de árvore ocidental)

A. sollicitans (mosquito castanho de pântano salgado)

Aedes sp.

A. Taeniorhynchus (mosquito negro de pântano salgado)

A. tarsalis

A. tormentor

A. triseriatus

A. vexans (mosquito de alagado continental)

Anopheles crucians

A. freeborni

A. quadrimaculatus (mosquito comum da malária)

A. sergentii

A. stephensi

Anopheles sp.

Chironomus plumosus (Chironomus: mosquito-pólvera)



Chironomus sp.

C. tumid

Culex erraticus

C. inornata

C. nigropalpus

C. peus

C. pipiens (mosquito doméstico do norte)

C. quinquefasciatus (C. pipiens fatigans) (mosquito doméstico do sul).

C. restuans

Culex sp

C. tritaeniorhynchus

C. tarsalis (mosquito da encefalite ocidental).

C. territans

C. inivittatus

Culiseta incidens (Culiseta: mosquitos)

C. inornata

Diamessa sp.

Dixa sp. (Dixa: mosquito pólvora)

Eusimulium (Simulium) latipes (Eusimulium: mosquitos)

Goeldichironomus holoprasinus

Haematobia irritans (mosquito trombeteiro)

Hippelates colluser

Ogdamia ornata

Pales pevida

Polpomyia sp. (Polpolyia: mosquito pólvora, mordedor)

Psorophora ciliata

P. columiæ (confinnis)(mosquito dos Glades da Flórida, mosquito negro do arrozal).

P. ferox

Simulium alcocki (Simulium: pulgões do algodão)

S. argus

S. corvicornutum

S. damnosum

S. jenningsi

S. piperi.





A. pometaria (lagarta do cancro de outono)  
Amorbia assigana  
Anadevidia (Plusia) peponis  
Anisota senatoria (lagarta do carvalho riscada, côr de laranja)  
Anomis flava  
A. (cosmophila) sabulifera  
Antheraea pernyi  
Anticarsis gemmatalis (lagarta aveludada do feijão)  
Apocheima (Biston) hispidaria  
A. pilosaria (pedaria)  
Aporia crataegi (traça branca com veios negros)  
Archips argurospilus (enroladora de folha de árvores frutíferas).  
A. cerasivoranus (lagarta de ninho feio)  
A. crataegana  
A. podana  
A. (Cacoecia) rosana  
A. xylosteana  
Arctia caja  
Argyrotaenia mariana (enroladora de folhas de risca cinzenta)  
A. velutinana (enroladora de folhas de risca vermelha)  
Ascia (Pieris) monuste orseis  
Ascotis selenaria  
Atteva aurea (lagarta de teia do alianto)  
Autographa californica (larva da alfafa)  
A. Plusia) gamma  
A nigrisigna  
Autoplusia egea (devoradora de folhas de feijão)  
Azochis gripusalis  
Bissetia steniella  
Bombyx mori (bicho da seda )  
Brachyonicha sphinx  
Bucculatrix thurberiella (perfuradora da folha do algodoeiro)  
Bupalus piniarius (Bupalus:larva)  
Cacoecimorpha pronubana

55.710

Ref:384116



Cactoblastis cactorum  
Caliptilia (Gracillaria) invariabilis  
C. (G.) syringella (mineira da folha de lilás)  
C. (G.) theivora  
Canephora asiatica  
Carposina niponensis  
Ceramidia sp. .  
Cerapteryx graminis  
Chilo auricilius  
C. sacchariphagus indicus  
C. suppressalis (perfuradora da haste do arrozeiro)  
Choristoneura fumiferana (lagarta do broto do abeto verme-  
lho)  
C. murinana (enroladora do broto do abeto)  
Chrysodeixis (Plusia) chalcites  
Clepsia spectrana  
Cnaphalocrocis medinalis  
Coleotechnites (Recurvaria) milleri (mineira de agulha das  
estacas)  
C. nanella  
Colias eurytheme (lagarta da alfafa)  
C. lesbia  
Colotois pennaria  
Crambus bonifatellus (traça fulva dos relvados lagarta da  
grama).  
C. sperruellus  
Crambus spp.  
Cryptoblabes gnidiella  
Cydia funebrana  
C. (Grapholitha) molesta (traça oriental da fruta)  
C. (Laspeyresta) pomonella (traça dos pomídeos)  
Datana integerrima (lagarta da noz)  
D. ministra (lagarta de gola amarela)  
Dendrolimus pini  
D. sibiricus



Depressaria marcella (uma lagarta tecelã)  
 Desmia funeralis (enroladora da folha da uva)  
 Diachrisia (Plusia) orichalcea (uma semi-larva)  
 Diacrisia virginica (lagarta lanosa amarela)  
 Diaphania (Margaronia) indica  
 D. nitidalis (lagarta do picole)  
 Diaphora mendica  
 Diatraea grandiosella (broca de milho do sudoeste)  
 D. saccharalis (broca da cana de açúcar)  
 Dicomeris marginella (lagarta tecelã de junipero)  
 Drymonia ruficornis (as chaonia)  
 Drymonia sp  
 Dryocampa rubicunda  
 Earias insulana  
 Ectropis (Boarmia) crepuscularia  
 Ennomos subsignarius (lagarta do olmo)  
 Ephestis (Cadra) cautella (traça da amendoeira)  
 E. Elutella (traça do tabaco)  
 E. (Anagasta) kuehniella (traça mediterrânica da farinha)  
 Epinotia tsugana (uma devoradora de folhas)  
 Epiphyas postvitanna  
 Erannis defoliaria (traça mosqueada castanha)  
 E. tiliaria (larva da tília)  
 Erinyasis ello  
 Eriogaster henkei  
 E. laeestrís  
 Estigmene acrea (lagarta dos pântanos salgados)  
 Eublemma amabilis  
 Euphydryas chalcedona  
 Eupoecilia ambiguella  
 Euproctis chryorrhoea (Nygmi phaeorrhoea) (traça de cauda  
 castanha)  
 E. fraterna  
 E. pseudoconspersa  
 Eupterote fabia

*Euteneula* (*Simacthis*) *pariana*  
*Euxoa* *messaria* (lagarta cortadora de flancos escuros)  
*Galleria* *mollonella* (traça da cêra, grande)  
*Gastropacha* *quercifolia*  
*Halisdota* *argentata*  
*H. caryae* (traça dos tufos da noqueira)  
*Marrisina* *brillians* (devoradora das folhas da uva ocidental)  
*Hedya* *nubiferana* (traça tortrix das árvores frutíferas)  
*Heliothis* (*Helicoverpa*) *argigera* (*Heliothis Chloridea*)  
 (broca da vagem do grão de bico)  
*H. (H.) assulta*  
*Heliothis* *peltigera*  
*H. virescens* (lagarta do broto de tabaco)  
*H. virescens*  
*H. zea* (lagarta do algodão, lagarta do milho, lagarta da  
 soja, lagarta do tomate, lagarta do sorgo, etc.)  
*Hellula* *undalis* (lagarta tecelã do repolho)  
*Herpetogramma* *phaeopteralis*  
*Heterocampa* *guttivitta* (saliente selada)  
*H. mantec* (lagarta variável da folha do carvalho)  
*Holcocera* *pulverea*  
*Homocidus* *electellum* (traça do girassol)  
*Homona* *magnanima*  
*Hyloicus* *pinastri*  
*Hypocrita* *coriopa*  
*Hyphantria* *cunea* (lagarta tecelã do outono)  
*Hypogimna* *morio*  
*Itame* (*Thamnomima*) *wauaria* (uma lagarta)  
*Junonia* *coenia* (lagartas do castanheiro)  
*Kakivoria* *flavofasciata*  
*Keiferia* (*Anarismoschema*) *lycopersicella* (lagarta do tomate)  
*Lacanobia* (*Polia*) *oleracea*  
*L. fuscicollis* *fuscicollis* (larva do abeto)  
*L. fuscicollis* *lugubrosa*  
*L. fuscicollis* *somnaria*  
*Lampides* *boeticus*



- Leucoma (Stilpnotis) salicis (traça de cetim)  
L. wiltshirei  
Lobesia (= Polychrosis) botrana  
Loxostege monmixtalis (lagarta tecelã da alfafa)  
L. sticticalis (lagarta tecelã da beterraba)  
Lymantria (Porthetria) dispar (traça cigana) (Lymantria  
traças das moitas)  
L. monacha (lagarta da traça freira)  
Lalacosoma americana (lagarta de tenda oriental)  
M. Disstria (lagarta de tenda da floresta)  
M. fragilis (=fragile) (lagarta de tenda da Grande Bacia)  
M. neustria (lagarta de tenda, traça lacaio)  
M. neustria var. testacea  
M. pluviale (lagarta de tenda ocidental)  
Mamestra brassicae (traça do repolho)  
Manduca (inotoparce) quinquemaculata (lagarta do tomate)  
M. (I.) sexta (lagarta do tabaco)  
Maruca testulalis  
Melancliphia imitata  
Mesographu forficalis  
Mecis repanda (Mecis: semi-larva)  
Molippa sabina  
Monema flavescens  
Mythimna (Pseudaletia) unipuncta (lagarta militar)  
Nephantis serinopa  
Noctua (Triphaena) pronuba  
Nomophila noctuella (traça da lucerna)  
Nymphalis antiopa (borboleta de luto)  
Oiketicus moyanoi  
Ommatopteryx texans  
Operophtera brumata (traça de inverno)  
Opsophanes sp.  
O. fagata  
Orgyia (Hemerocampa) antiqua  
O. leucostigma (traça das moitas, com marcas brancas)

55.710

Ref:384116

O. (H.) pseudotsugata (traça do tufo do pinheiro Douglas)

O thyellina

Orthosia gothica

Ostrinia (pyraustra) nubilalis (broca de milho europeia)

Palaecrita vernata (lagarta do cancro de primavera).

Pammene juliana

Pandemis Dumetana

P. purusana

Panolis flammea

Papilio cresphontes (cão laranja)

P. demoleus

P. philenor

Paralipsa (Aphemia) gularis

Paralobesia viteans

Paranyelois transitella

Parara guttata

Pectinophora gossypiella (lagarta côr de rosa)

Pericallis ricini

Peridroma saucia (lagarta cortadora variogada)

Phalera bucephala

Phlogophora meticulosa

Phryganidia californica (lagarta do carvalho da California)

Phthorimaea (=Gnorimoschema) operculella (lagartas do tuberculo da batata)

Phyllonorycter (Lithocolletis) blancardella

Pieris brassicae (borboleta branca grande)

P. canidia sordida

P. rapae (lagarta do repolho importada, borboleta branca pequena)

Plathypena scabra (larva verde do trevo)

Platynota sp.

P. stultana

Platyptilia Carduidactyla (traça da pluma de alcachofra)

Plodia interpunctella (traça da comida india)

Plutella xylostella as maculipennis (traça de costas em diamante)

55.710

Ref:384116



Prays citri (traça da flor dos citrinos)  
O. oleae (traça da oliveira)  
Pseudoplusia includens (larva da soja)  
Pygaera anastomosis  
Rachiplusia ou  
Rhyacionia buoliana (traça europeia do broto de pinheiro)  
Sabulodes caberata  
Samia cynthia  
Saturnia pavonia  
Schizura concinna (lagarta de corcova vermelha)  
Schoenobius bipunctifer  
Selenophera lunigera  
Sesamia inferens  
Sibine apicalis  
Sitotroga cerealella (mariposa Angoumois dos cereais)  
Sparganoti pilleriana  
Spilonota (Tmetocera) ocellana (traça dos brotos com manchas  
de olhos)  
Spilosoma lubricipeda (as menthastris)  
S. virginica  
Spilosoma sp.  
Spodoptera (prodenia) aridania (lagarta militar sulina)  
S. exigua (lagarta da beterraba, lagarta da lucerna)  
S. frugiperda  
S. littoralis  
S. litura  
S. mauritia  
S. (P.) ornithogalli (lagarta de faixas amarelas)  
S. (P.) praefica  
Syllepte derogata  
S. silicalis  
Symmerista canicosta  
Thaumetopoea pityocampa (lagarta processionária do pinheiro)  
T. processionea  
T. wauarua (lagarta tecelã da groselheira)  
Thymelicus leneola (saltadora europeia)

55.710

Ref:384116



Thyridopteryz ephemeraeformis (lagarta de saco)

Tineola bisselliella (traças das roupas)

Tortrix viridana (tortricida do carvalho)

Trichoplusia ni (larva do repolho)

Udea profundalis (amarradora de folha de aipo)

U. rubigalis

Vanessa cardui (dama pintada)

V. io

Zanthopastis tinais

Xestia (Amathea, Agrotis) c-nigrum (lagarta cortadeira manchada)

yponomeuta cognatella (=U. evonymi) (yponeutra = Hyponomeuta).

Y. evonymella

Y. mahalebella

Y. malinella (pequena traça arminho)

Y. padella (pequena traça arminho)

Y. rorrella

Zeiraphera diniana

#### MALLOPHAGA

Bovicola bovis (piolho do gado)

B. crassipes

B. limbata

B. ovis

Lipeurus caponis (piolho alado)

Menacnathus stramineus

Menopon gallinae (piolho das árvores)

#### TRICHOPTER.

Hydropsyche pellucida

Ptamophylax rotundipennis



TABELA 2

Plantas recomendadas para protecção pela proteína insecti-  
cida do B. thuringiensis

alfafa	escarola	batatas
amendoiras	milho de campo	rabanetes
maças	aveleiras	pastagens
alcachofras	flores	framboesa
abacates	plantações de for- ragem	açafrão
bananas	árvores florestais	árvores de sombra
feijões	árvores frutíferas	shingiku
Beterrabas	alho	cereais pequenos
amoras negras	uvas	soja
mirtilos	feno	espinafre
bróculos	cáli	abóbora
couve de Bruxe- las	kiwi	frutas de caroço
repolho	couve rábano	milho ensilados
oxicocos	lentilhas	cereais ensilados
cenouras	alface	sementes oleaginosas armazenadas
couve-flor	melões	amendoins armazena- dos
aipo	hortelã	soja armazenada
acelga	folhas de mostarda	tabaco armazenado
cerejas	nectarinas(var. pes- sego)	morangos
repolho chinês	cebolas	beterrabas açucarei- ras
crisantemos	laranjas	bordo açucareiro
citrinos	árvores ornamentais	girassol
collards (Bras- sica Oleracea var. acephala)	salsa	milho doce



alface cas	pastagem	batata doce
algodão	pêssegos	tabaco
oxicoco	amendoim	tomates
plantações de	peras	relva
sementes		
pepinos	ervilhas	folhas de nabo
groselha	nogueira-pecã	nozes
amoras negras	pimentas	melancia
berinjela	pequidões	
eudivia	romã	

TABELA 3

Variedades de B. thuringiensis

alesti  
aizawai  
cnadensis  
dakota  
darmstadiensis  
dendrolimus  
entomocidus  
finitimus  
fowleri  
galleriae  
indiana  
israelensis  
kenyae  
kurstaki  
kyushuensis  
morrisoni  
ostrinae  
pakistani  
setto



thompsoni  
 thuringiensis  
 tolworthi  
 toumanoffi  
 wuhanensis

TABELA 4

Índice de plasmídios e estirpes

<u>Estirpe</u>	<u>Plasmídio</u>	<u>Construído ou usado</u>	<u>Vide</u>	<u>Exemplo</u>	<u>Figura</u>	<u>Feito de</u>	<u>(&amp; Comentários)</u>
<u>A. tumefaciens</u>		6					(ubiquo)
<u>A. rhizogenes</u>		5					(vide também o histórico)
<u>B. thuringiensis var.</u>							
<u>kurtaki</u>	HD-73	1.1	1				
<u>ColE1</u>		2.5					
<u>E. coli</u>	GM33	2.3					
<u>E. coli</u>	HBL01	1.1					
<u>E. coli</u>	JM103	2.1					
<u>E. coli</u>	K802	2.2					
<u>MBT3</u>		3.3					M13mp8, p123/58-10
<u>MBT3(Nco)</u>		3.4					MBT3
<u>MBT14</u>		3.3					M13mp8, p123/58-10
<u>mWB2344</u>		2.1					
<u>mWB2344</u>		2.1					
<u>M13-Bt-A</u>		2.1					mWB2344, p123/58-10
<u>M13-Bt-A(Bam)</u>		2.1					M13-Bt-A

55710

Ref: 384116



Índice de plasmídios e estirpes

Estirpe	Plasmídio	Construído ou usado	Vide	Figura Feita de (& Comentários)
M13-Bt-S		2.1		mWB2344, p123/58-10
M13mp7		3.1		
M13mp8		3.3		
M13-PpBt		4.4		MBT3(Nco), M13-3.8Ab
M13-1		3.1		M13mp7, pNS5
M13-3		3.1		M13mp7, pNS5
M13-3A/B18a		3.2		M13-3
M13-3.8A		4.1		M13mp7, 177.4
M13-3.8Aa		4.2		M13-3.8Ac
M13-3.8Ab		4.3		M13-3.8Aa
M13-3.8Ac		4.2		M13-3.8A
M13-3.8S		4.1		M13mp7, 177.4
pBR322		1.1		
PCF44		3.1		pBR322, pT1C58
pCT44a		3.1		pCF44
pKS-proI		2.2	3	pKS111
pKS-proI(Bam)		2.2	2.2	pKS-proI
pKS-4		2.5	2	pBR322, pRZ102
pKS111		2.2	2,3	pRK290, pT115955
pKS111-K		4.5		pKS4(pRZ102), pKS111
pKS111-N		3.5		pCF44, pKS111-K
pKS111-NpBt		3.5		MBT3(Nco), M13-3A/B18a, pKS111-N
pKS111-PpBt		4.5		M13-PpBt, pKS111-K
pNS5		3.1		pBR322, pCF44a
pPhIj1		9		
pRK290		2.2,9		
pRK2013		9		
pRZ102		2.5		ColE1, Tn5
pT1a66		2.4		
pT15955		2.4	2	



Índice de plasmídios e estirpes

<u>Estirpe</u>	<u>Plasmídeo</u>	<u>Construído ou usado</u>	<u>Vide</u>	<u>Exemplo Figura Feito de (&amp;Comentários)</u>
p8.8		4.1		pBR322,177.4
p11-83a		2.3	3	pKS-proI( <u>Bam</u> ), pKS-4
p11-83b		2.3	3	p11-83a, M13-Bt-A( <u>Bam</u> )
p123/58-3		1.1	1	<u>B.thuringiensis</u> , var. <u>Kurstaki</u> HD-73, pBR322
p123/58-10		1.1	1	<u>B.thuringiensis</u> , var. <u>Kurstaki</u> , HD-73, pBR322
p403		2.2	2	pBR322, pT115955
"1.6"		2.2	2	(=transcrição 24, vide também Descrição De- talhada)
177.4		4.1		Charon 24A, <u>P.vulgaris</u> cv. Tendergreen.
pBt73-16		11.2	4	pBt73-10( <u>Bam</u> ), pBt73-161
pBR325		12.1	4	
pRR325aBB		12.1	4	pRR325
p403B		12,1	4	pBR325aBB, pTR-proI( <u>Bam</u> )
M13m19		12.2	4	
1.6.4		12.2	4	M13mp19, pBt73-16
1.6.4B-3.8.3		12.2	4	1.6.4
p403B/BTB#3		12.3	4	1.6.4B-3.8.3, p403B
pRK-203-Kan-103-Lec		12.4	4	
pRK-203-Kan-103		12.4	4	pRK-203-Kan-103-Lec

Mod. 71 - 10 000 ex. - 09-84



TABELA 5

Estirpes Depositadas

NERL B-4488	<u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>Kurstaki</u> HD-73
NERL B-14394	<u>Escherichia coli</u> C600 (pKS-4)
NERL B-11371	<u>Escherichia coli</u> HB101
NERL B-12014	<u>Escherichia coli</u> RR1 (pBR322)
ATCC 37017	pBR322
ATCC 15955	<u>Agrobacterium tumefaciens</u> (pTi15955)
NERL B-15393	<u>Escherichia coli</u> HB 101 (p8.8)
NERL B-15612	<u>Escherichia coli</u> HB101 (p123/58-10)
NERL B-15759	<u>E. coli</u> HB101 (pBt73-16)
NERL B-15821	<u>E. coli</u> C600 (pRK-203-Kan-103-Lec)

O depósito do primeiro pedido para o invento acima descrito foi efectuado nos Estados Unidos da América em 24 de Setembro de 1983 sob o nº. 535.354;

- R E I V I N D I C A Ç O E S -

1ª. Processo para modificar geneticamente uma célula vegetal, caracterizado pelo facto de se transformar a célula que possui um gene estrutural insecticida e um promotor expressável vegetal, por meio do qual o gene é expressável na célula vegetal sob o controlo do promotor.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o gene insecticida estar sob o con-



trole de um promotor vegetal.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o gene insecticida estar sob o controlo de um promotor escolhido do grupo de genes vegetais constituído por faseolina e a sub-unidade pequena de ribulosa-1,5-bisfosfatocarboxilase.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o gene estrutural insecticida estar sob o controlo de um promotor de T-DNA.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de o gene estrutural estar sob o controlo de um promotor escolhido de um grupo de genes de T-DNA constituído por tmr, tml, tms, nos, ocs e a transcrição "1,6".

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o gene insecticida estar sob o controlo de um promotor escolhido do grupo de promotores de CaMV que controlam as transcrições 35S e 19S.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o gene insecticida é modificado, caracterizado pelo facto de a modificação ser obtida por uma inserção, uma supressão ou uma substituição de um ou mais nucleótidos na sequência do nucleótido do gene estrutural.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o gene ser inserido em T-DNA.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, em que se modifica o T-DNA, caracterizado pelo facto de a modificação ser uma inserção, uma supressão ou uma substituição de um ou mais nucleótidos na sequência do nucleótido de

55.710

Ref:384116



T-DNA

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de a célula transformada ser de uma gimnosperma.

11ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de a célula transformada ser de uma angiosperma.

12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de a angiosperma ser uma monocotiledónea.

13ª. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de a angiosperma ser uma dicotiledónea.

14ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a dicotiledónea ser um membro da família das Solanaceae.

15ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a dicotiledónea ser um membro da família das Compositae.

16ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a dicotiledónea ser um membro da família das Leguminosae.

17ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a dicotiledónea ser um membro da família das Malvaceae.

18ª. - Processo de acordo com a reivindicação 11, ca-

racterizado pelo facto de a dicotiledónea ser um legume.

19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de o gene insecticida ser inserido num local transcrito activamente no interior do gene tml ou do gene ocs, ou da região "1.6" do T-DNA.

20ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de a célula vegetal ser transformada por transferência de DNA de uma bactéria para a célula vegetal.

21ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a célula vegetal ser transformada por captação directa de DNA ou micro-injecção de DNA na célula vegetal.

22ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender ainda a fase de regenerar a referida célula transferida para produzir tecido vegetal regenerado, transformado, capaz de expressar o gene estrutural insecticida.

23ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o gene estrutural insecticida se obter a partir de *B. thuringiensis*.

24ª. - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o gene estrutural insecticida ser hibridizável com o encontrado no pl23/58-10.

Entrelinhei: na pg. 30 "usado" e na pg. 59 "mutados".  
Lisboa, 24.SET.1984

Por AGRIGENETICS RESEARCH ASSOCIATES LIMITED

AGENTE OFICIAL





AACTGGATTTATATAAGTATAAAAGTAAATAAGACTTTAAATAAGTTAACGGAAATCAAAACCTTAAATGCATTGGTTAAACATTGTAAAGTCTAAA 100  
GCATGGATAATGGCGGAGAACTAAGTAGATTGTAAACACCTGGGTCAAAAATTGATATTAGTAAATAGTTGCACCTTTGGCATTITTTGATAAGAT 200  
GAGTCATATGTTTTAAATGTAGTAATGAAAACAGTATTATATCATAAATGAATGGTATCTTAATAAAGAGATGGAGTAAGTTATGGATAACAATGC 300  
.....  
HetAspAsnAsnPr  
GAACATCAATGAATGCATTCCCTATAATTGTTAAGTAACCTGAAGTAGAAGTATTAGGTGGAGAAGAATAGAACTGGTTACACCCCAATCGATATT 400  
oAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeuGlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIle  
TCCTTGCCTAACGCAATTCCTTTGAGTGAATTTGTTCCCGCTCGGATTTGCTTAGGACTAGTTGATATAATATGGGAATTTTGGTCCCTCTC 500  
SerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSerGluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerG  
AATGGGACGCATTTCTGTACAAATGAACAGTTAATTAACCAAGAATAGAAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTAGAAGGACTAAGCAA 600  
InTrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAlaIleSerArgLeuGluGlyLeuSerAs  
TCITTTCAAAATTAGCCAGAATCTTTAGAGAGTGGGAAGCAGATCCTACTAATCCAGCATTAGAGAAGAGATGCGTATTCAAATTCATGACATGAAC 700  
nLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAspProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsn  
AGTCCCTTACAACCGCTTCTCTTTTGCAGTCAAAATATCAAGTTCCCTTTTATCAGTATATGTTCAAGCTGCAGAAATTTACATTTATCAGTTT 800  
SerAlaLeuThrThrAlaIleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHisLeuSerValL  
TGAGAGATGTTTCAGTGTGGACAAGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTAGCAATAGTCTTATAATGATTTAACTAGCCTTATGGCAACTATACAGA 900  
euArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrSerAsnSerArgTyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAs  
TTATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAACGTGTATGGGGACCGGATTCAGAGATTGGTAAAGTATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTA 1000  
pTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGluArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeu  
ACTGTATTGATATCGTGTCTGTTCCGAAATATGATAGTAGAAGATATCCAATTCGAACAGTTTCCCAATTAACAAGAGAATTTATACAACCCAG 1100  
ThrValLeuAspIleValAlaLeuPheProAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThrArgGluIleTyrThrAsnProV  
TATTAGAAAATTTGATGGTAGTTTTCGAGGCTCGGCTCAGGCGATAGAAAAGATATTAGCAGTTCACATTTGATGGATATACCTAACAGTATAACCAT 1200  
alLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGluArgSerIleArgSerSerHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrI  
CTATACGGATGCTCATAGGGTATTATTATTTGGTCAGGCCATCAAAATATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCGGGCCAGAATTCACCTTTCCGCTATAT 1300  
eTyrThrAspAlaHisArgGlyTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPheProLeuTyr  
GGAACTATGGAAATGCAGCTCCACAACAAGTATTGTCTCACTAGGTCAGGGCGTATAGAACATTATCGTCCACTTTATAGAAAGACCTTTTA 1400  
GlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArgThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheA  
ATATAGGGATAAATAACAACACTATCTGTTCTGACGGCAGACAATTTGCTTATGCAACCTCCTCAAATTTGGCATCCGCTGTATACAGAAAAGCGG 1500  
snIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAspGlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerG

FIG. 1 - 1



AACGGTAGATTCCGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACACGTCGCCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTCA 1600  
yThrValAspSerLeuAspGlu11leProProGlnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHisVal1SerMetPheArgSer  
GGCTTTAGTAATAGTAGTAAAGTATAAAGAGCTCCTATGTTGCTGGATACATCGTAGTGTGAATTAATAATAATGCAATCGGATAGTATTA 1700  
GlyPheSerAsnSerSerValSer11elleArgAlaProMetPheSerTrp11eHisArgSerAlaGluPheAsnAsn11elleAlaSerAspSer11eT  
CTCAAATCCCTGCCAGTGAAGGAAACTTCTTTTAAATGTTCTGTAATTCAGGACCAGGATTTACTGGTGGGGACTAGTTAGATTAATAGTAGTGG 1800  
hrGln11eProAlaVal1LysGlyAsnPheLeuPheAsnGlySerVal11eSerGlyProGlyPheThrGlyGlyAspLeuValArgLeuAsnSerSerGI  
AAATAACATTCAGAATAGAGGGTATATGAAAGTCCAAATTCACCTCCCATCGACATCTACCAGATATCGAGTTCGTGTACGGTATGCTTCTGTAACCCG 1900  
yAsnAsn11aGlnAsnArgGlyTyr11eGluValPro11eHisPheProSerThrSerThrArgTyrArgValArgValArgTyrAlaSerVal1ThrPro  
ATTCAGCTCAACGTTAATGGGGTAAATTCATCCATTTTTCCAATACAGTACCAGCTACAGCTACGCTATTAGATAATCTACAATCAAGTATTTGGTT 2000  
11eHisLeuAsnVal1AsnTrpGlyAsnSerSer11ePheSerAsnThrValProAlaThrAlaThrSerLeuAspAsnLeuGlnSerSerAspPheGlyT  
ATTTTGAAGTGCCTTACATCTTACATCTTACATAGGTAATAGTAGGTTAGAAATTTAGTGGGACTGCAGGAGTATAAGACAGATTTGAAT 2100  
yrPheGlySerAlaAsnAlaPheThrSerSerLeuGlyAsn11eValGlyValArgAsnPheSerGlyThrAlaGlyVal11elleAspArgPheGluPh  
TATTCAGTACTGCAACACTCGAGGCTGAATATAATCTGGAAGAGGCGAGAAGGGGTAATGGCTGTTTACGCTCAAAACCACTAGCGCTAAAA 2200  
e11eProVal1ThrAlaThrLeuGluVal11eGlyTyrAsnLeuGluArgAlaGlnLysAlaValAsnAlaLeuPheThrSerThrAsnGlnLeuGlyLeuLys  
ACAAATGTAACGGATTATCATATGATCAAGTGTCCAATTTAGTACGTATTTATCGGATGAATTTTGTCTGGATGAAAGCGAGAATTTGTCGAGAAAG 2300  
ThrAsnVal1ThrAspTyrHis11eAspGlnVal1SerAsnLeuVal1ThrTyrLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSer61vLysY  
TCAAAGATGCGAAGGCACCTAGTGAATGCAAGCAATTTACTCCAAGTTCAAATTTCAAAGACATTAATAGGCAACGAGAGCTGGTGGGGCGAAGTAC 2400  
e11LysHisAlaLysAlaLeuSerAspGluArgAsnLeuGlnAspSerAsnPheLysAsp11eAsnArgGlnProGluArgGlyTrpGlyGlySerTh  
AGGGATTACCATCCAAGGGGGATGACGTATTTAAAGAAAATACCTCACACTATCAGGTAGCTTTGATGAGTGTATCCAAATATTTGATCAAAAA 2500  
rGly11eThr11eGlnGlyGlyAspAspVal1PheLysGluAsnTyrVal1ThrLeuSerGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLys  
ATCGATGAATCAAAATTAAGCCCTTACCGGTTATCAATTAAGAGGCTATATCGAAGATAGTCAAGACTAGAAATCTATTAAATTCGCTCAATGCCAA 2600  
11eAspGluSerLysLeuLysAlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyr11eGluAspSerGlnAspLeuGlu11eTyrLeu11eArgTyrAsnAlaL  
AACATGAACAGTAAATGTGCCAGGTACGGTTCCTTATGCCCCCTTCAGCCCAAGTCCAAATCGGAAAGTGGAGAGCCGAATCGATCGCCGACACA 2700  
ysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerPro11eGlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProH  
CCTTGAATGGAACTCGACTAGATTGTTGCTGTAGGATGGAGAAAGTGTGCCATCATTCGGATCATTTCTCCTTAGACATTGATGAGGATGATCA 2800  
sLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArgAspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAsp11eAspVal1GlyCysThr  
GACTAAATGAGGACTAGGTATGGGTGATCTTAAAGATTAAGACCAAGATGGCCAGCAAGACTAGGAAATCAGAGTTTCTCGAAGAGAAACCAT 2900  
AspLeuAsnGluAspLeuGlyVal1TrpVal11ePheLys11eLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGluPheLeuGluGluLysProL  
TAGTAGGAGAGCGCTAGCTCGTGTGAAGAGCGGAGAAAATGGAGAGCAAACTGAAAAATGGAAATGGGAAACAAATATCGTTTATAAAGAGGC 3000  
euVal1GlyGluAlaLeuArgVal1LysArgAlaGluLysLysTrpArgAspLysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsn11eVal1TyrLysGluAl  
AAAAGAACTCTGTAGATGCTTTATTTGTAACCTCAATATGATCAATTACAAGCGGATACGAATATTCGCATGATTCATCGGCGAGATAACGTTGTCAT 3100  
sLysGluSerVal1AspAlaLeuPheVal1AsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsn11eAlaMet11eHisAlaAlaAspLysArgVal1His  
AGCATTCGAGAAGCTT  
Ser11eArgGluAlaT 3116

FIG. 1 - 2

pTi15955 T-DNA

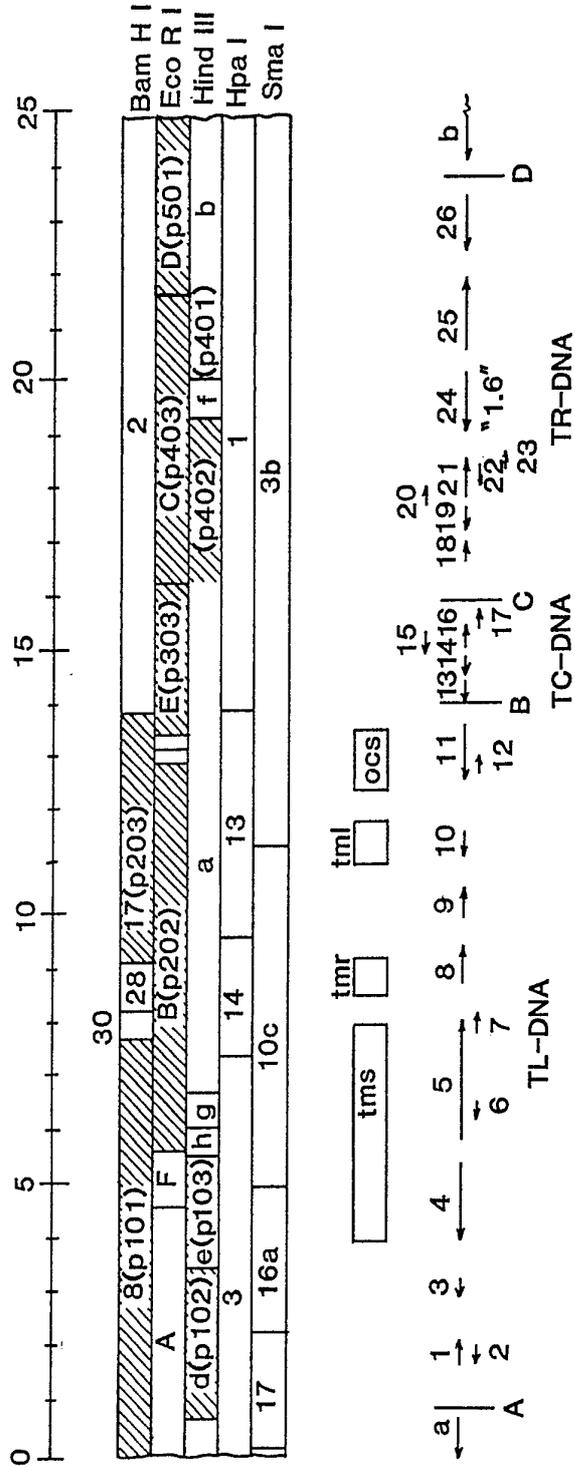


FIG. 2



5571

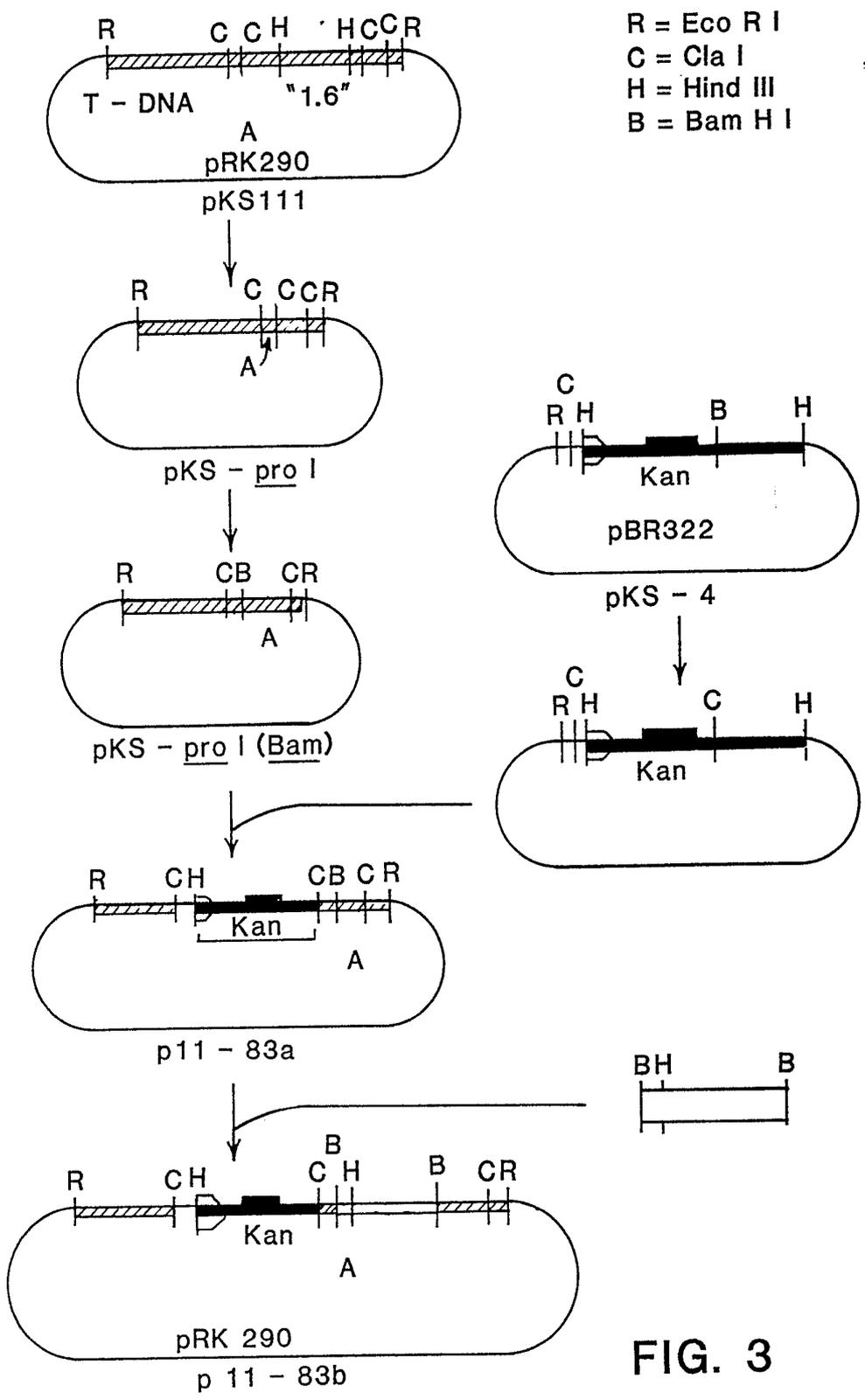


FIG. 3

55410



FIG.4

