

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

(22) Data de pedido: 2005.12.19	(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC 800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD ST. LOUIS, MISSOURI 63167 US
(30) Prioridade(s): 2004.12.21 US 638099 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.09.05	(72) Inventor(es): ADRIAN LUND US
(45) Data e BPI da concessão: 2014.02.26 100/2014	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PLANTAS TRANSGÉNICAS COM CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS MELHORADAS**

(57) Resumo:

DIVULGAÇÃO DESCREVE O RASTREIO DE UMA POPULAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DERIVADAS DE CÉLULAS VEGETAIS TRANSFORMADAS COM ADN RECOMBINANTE PARA A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS HOMEBOX PARA IDENTIFICAR PLANTAS DE CÉLULAS DE ACONTECIMENTOS TRANSGÉNICOS ESPECÍFICOS QUE SÃO ÚTEIS PARA CONFERIR CARACTERÍSTICAS MELHORADAS A PLANTAS DE CULTIVO TRANSGÉNICAS. AS CARACTERÍSTICAS INCLUEM UMA EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE AZOTO MELHORADA, UM RENDIMENTO MAIS ELEVADO, UMA EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE ÁGUA SUPERIOR, UMA TOLERÂNCIA A STRESS PELO FRIO MELHORADA E/OU MELHORES COMPOSIÇÕES DE SEMENTES. TAMBÉM SE DIVULGAM SEMENTES TRANSGÉNICAS PARA O CRESCIMENTO DE UMA PLANTA TRANSGÉNICA COM O ADN RECOMBINANTE NO SEU GENOMA E APRESENTANDO A CARACTERÍSTICA MELHORADA RASTREADA. TAMBÉM SE DIVULGAM MÉTODOS PARA GERAR SEMENTES E PLANTAS BASEADAS NOS EVENTOS TRANSGÉNICOS.

RESUMO**"PLANTAS TRANSGÉNICAS COM CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS
MELHORADAS"**

A divulgação descreve o rastreio de uma população de plantas transgênicas derivadas de células vegetais transformadas com ADN recombinante para a expressão de proteínas com domínios "homeobox" para identificar plantas de células de acontecimentos transgênicos específicos que são úteis para conferir características melhoradas a plantas de cultivo transgênicas. As características incluem uma eficiência de utilização de azoto melhorada, um rendimento mais elevado, uma eficiência de utilização de água superior, uma tolerância a stress pelo frio melhorada e/ou melhores composições de sementes. Também se divulgam sementes transgênicas para o crescimento de uma planta transgênica com o ADN recombinante no seu genoma e apresentando a característica melhorada rastreada. Também se divulgam métodos para gerar sementes e plantas baseadas nos eventos transgênicos.

DESCRIÇÃO

"PLANTAS TRANSGÉNICAS COM CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS MELHORADAS"

Campo da Invenção

Divulgam-se aqui são invenções no campo da genética de plantas e biologia do desenvolvimento. Mais especificamente, as invenções fornecem células vegetais de milho com ADN recombinante para proporcionar um rendimento melhorado numa planta de milho transgénica, plantas de milho que compreendem essas células, sementes e pólen derivado de tais plantas de milho, métodos para a produção e para a utilização de tais células, plantas, sementes e pólen. Em particular, o ADN recombinante expressa um factor de transcrição com domínios "homeobox".

Antecedentes da Invenção

Plantas transgénicas com características agronómicas melhoradas tais como rendimento, tolerância ao stress ambiental, resistência a pragas, tolerância a herbicidas, composições de sementes melhoradas e afins são desejadas tanto por agricultores como por consumidores. US 2004/0019 927 descreve plantas transgénicas com um rendimento aumentado devido à sobre-expressão de um factor de transcrição.

Apesar de esforços consideráveis no melhoramento de plantas terem proporcionado ganhos significativos em características desejadas, a capacidade de introduzir ADN específico em genomas de plantas fornece oportunidades para a geração de plantas com características melhoradas e/ou exclusivas. A mera introdução de ADN recombinante num genoma da planta nem sempre produz uma planta transgénica com uma característica agronómica melhorada. Métodos para seleccionar acontecimentos transgénicos individuais a partir de uma população são necessários para identificar os fenómenos transgénicos que são caracterizados pela característica agronómica melhorada.

Sumário da Invenção

Esta invenção divulga ADN recombinante para a expressão de proteínas que são úteis para conferir um melhor rendimento às plantas de milho transgénicas. O ADN recombinante é proporcionado numa construção que compreende um promotor que é funcional em células vegetais e que está operacionalmente ligado ao ADN que codifica para uma proteína que tem uma identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 90% ao longo da totalidade de SEQ ID NO:5. De acordo com o aspecto da invenção são proporcionadas células vegetais de milho transgénico compreendendo o ADN recombinante acima, plantas transgénicas que compreendem uma pluralidade de tais células vegetais, a descendência de sementes transgénicas e pólen transgénico destas plantas. Plantas de milho que compreendem tais células vegetais de

milho apresentam um rendimento melhorado em comparação com plantas controlo que não têm o referido ADN recombinante. Tais plantas de milho podem ser obtidas por selecção a partir de uma população de plantas transgénicas regeneradas a partir de células vegetais transformadas com ADN recombinante e que expressam a proteína por rastreio de plantas transgénicas na população para um rendimento melhorado em comparação com plantas de controlo que não possuem o referido ADN recombinante.

Ainda noutro aspecto da invenção, as células vegetais, plantas, sementes e pólen compreendem ainda ADN que expressa uma proteína que proporciona tolerância à exposição a um herbicida aplicado a níveis que são letais para um tipo nativo da referida célula vegetal. Tal tolerância é especialmente útil não apenas como uma característica vantajosa em tais plantas, mas também é útil numa etapa de selecção nos métodos da invenção. Em aspectos da invenção, o agente de herbicida é um composto glifosato, dicamba, ou glufosinato.

Ainda outros aspectos da invenção proporcionam para plantas transgénicas que são homozigóticas para o ADN recombinante e sementes transgénicas da invenção de plantas de milho. Noutras realizações importantes para prática dos vários aspectos da invenção na Argentina, o ADN recombinante é proporcionado em células vegetais derivadas de linhas de milho que são e que mantêm a resistência ao vírus Mal de Rio Cuarto ou o fungo *Puccinia sorghi* ou ambos.

Esta invenção também proporciona métodos para o fabrico de uma semente não-natural, transgénica que pode ser usada para produzir uma cultura de plantas transgénicas com uma característica melhorada resultante da expressão de ADN recombinante estavelmente integrado para a expressão de uma proteína com SEQ ID NO: 5. Mais especificamente, o método compreende: (a) rastreio de uma população de plantas para um rendimento melhorado e um ADN recombinante, em que plantas individuais na população podem apresentar o rendimento a um nível inferior a, essencialmente o mesmo que, ou maior do que o nível com que a característica é apresentada em plantas de controlo que não expressam o ADN recombinante, (b) seleccionar a partir da população uma ou mais plantas que apresentam a característica a um nível superior do que o nível com que a referida característica é apresentada em plantas de controlo, (c) verificar que o ADN recombinante está integrado de forma estável nas referidas plantas seleccionadas, (d) a analisar o tecido de uma planta seleccionada para determinar a produção de uma proteína que tem a função de uma proteína codificada pelos nucleótidos numa sequência de SEQ ID NO: 1; e (e) recolher sementes de uma planta seleccionada. Num aspecto da invenção, as plantas na população compreendem ainda ADN que expressa uma proteína que proporciona tolerância à exposição a um herbicida aplicado a níveis que são letais para as células do tipo nativo e a selecção é efectuada tratando a população com o herbicida, por exemplo, um composto glifosato, dicamba, ou glufosinato. Num outro

aspecto da invenção, as plantas são seleccionadas pela identificação de plantas com a característica melhorada. Os métodos são especialmente úteis para a produção de sementes de milho. Noutro aspecto, as plantas compreendem ainda um ADN que expressa uma segunda proteína que confere às células vegetais com uma ou mais características agrónomicas melhoradas.

Um outro aspecto da invenção proporciona um método de produção de sementes de milho híbrido compreendendo a aquisição de sementes de milho híbrido a partir de uma planta de milho tolerante a herbicida que tem também estavelmente integrado o ADN recombinante que compreende um promotor que é (a) funcional em células vegetais e (b) está operacionalmente ligado ao ADN que codifica para uma proteína com SEQ ID NO: 5; em que uma planta de descendência transgénica regenerada de uma cópia da referida célula apresenta um rendimento superior em comparação com uma planta de controlo sem a referida construção de ADN; e em que a referida célula é seleccionada a partir de uma população de células transformadas com a referida construção de ADN por rastreio de plantas descendentes de células na referida população para um rendimento melhorado, em comparação com a referida planta de controlo. Os métodos compreendem ainda a produção de plantas de milho a partir da referida semente de milho híbrido, em que uma fracção das plantas produzidas a partir da referida semente de milho híbrido é homozigótica para o referido ADN recombinante, uma fracção das plantas produzidas a partir

da referida semente de milho híbrido é hemizigótica para o referido ADN recombinante, e uma fracção de plantas produzidas a partir da referida semente de milho híbrido não tem nenhum do referido ADN recombinante; seleccionar plantas de milho que são homozigóticas e hemizigóticas para o referido ADN recombinante, por tratamento com um herbicida; recolha de sementes a partir de plantas de milho sobreviventes tratadas com herbicida e plantar a referida semente para produzir novas plantas de milho descendentes; repetir os passos de selecção e recolha pelo menos uma vez para produzir uma linhagem de milho endogâmica; e cruzar a linhagem de milho endogâmica com uma segunda linhagem de milho para a produção de sementes híbridas.

Divulga-se ainda um método de selecção de uma planta que compreende células vegetais da invenção, utilizando um anticorpo imunorreactivo para detectar a presença da proteína expressa pelo ADN recombinante na semente ou tecido de planta.

Descrição Detalhada da Invenção

Tal como aqui utilizado uma "célula vegetal" significa uma célula vegetal que foi transformada com ADN recombinante estavelmente integrado, não-natural, por exemplo, através de transformação mediada por *Agrobacterium* ou por bombardeamento com micropartículas revestidas com ADN recombinante ou outros meios. Uma célula vegetal da presente invenção pode ser uma célula vegetal transformada

originalmente, que existe como um microrganismo ou uma célula descendente da planta que é regenerada em tecido diferenciado, por exemplo, numa planta transgênica com ADN recombinante não natural estavelmente integrado, ou sementes ou pólen derivado de uma planta transgênica de descendência.

Tal como aqui utilizado uma "planta transgênica" significa uma planta cujo genoma foi alterado pela integração estável de ADN recombinante. A planta transgênica inclui uma planta regenerada a partir de uma célula vegetal originalmente transformada e plantas transgênicas de descendência de gerações posteriores ou cruzamentos de uma planta transformada.

Tal como aqui utilizado "ADN recombinante" significa ADN que tenha sido geneticamente modificado e construído fora de uma célula incluindo ADN contendo ADN de ocorrência natural ou ADNc ou ADN sintético.

Tal como aqui utilizado, "sequência de consenso" significa uma sequência artificial de aminoácidos de uma região conservada de um alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas homólogas, por exemplo, tal como determinado por um alinhamento CLUSTALW da sequência de aminoácidos de proteínas homólogas.

Tal como aqui utilizado, "homólogo" significa uma proteína num grupo de proteínas que desempenham a mesma

função biológica, por exemplo, proteínas que pertencem à mesma família de proteínas Pfam e que proporcionam um reforço da característica comum em plantas transgênicas desta invenção. Os homólogos são expressos por genes homólogos. Genes homólogos incluem alelos que ocorrem naturalmente e variantes criadas artificialmente. A degenerescência do código genético proporciona a possibilidade de substituir, pelo menos, uma base da sequência que codifica para a proteína de um gene com uma base diferente, sem causar a alteração da sequência de aminoácidos do polipeptídeo produzida a partir do gene. Assim, um polinucleótido útil na presente invenção pode ter qualquer sequência de bases que tenha sido alterada de SEQ ID NO: 1 por substituição de acordo com a degenerescência do código genético. Homólogos são proteínas que, quando optimamente alinhadas, têm pelo menos 90% de identidade ao longo da totalidade do comprimento de uma proteína identificada como estando associada à concessão de uma característica melhorada quando expressa em células vegetais.

Os homólogos são identificados por comparação de sequência de aminoácidos, por exemplo, manualmente ou por utilização de uma ferramenta com base em computador utilizando algoritmos conhecidos de pesquisa à base de homologia, tais como os vulgarmente conhecidos e referidos como BLAST, FASTA, e Smith-Waterman. Um programa de alinhamento de sequências locais, por exemplo, BLAST, pode ser utilizado para pesquisar uma base de dados de sequências para encontrar sequências semelhantes, e o valor de Expectativa

resumido (valor E) utilizado para medir a semelhança de sequência de base. Como uma proteína detectada com o melhor valor de E para um organismo particular pode não ser necessariamente um ortólogo ou o único ortólogo, uma consulta recíproca é usada na presente invenção para filtrar sequências detectadas com valores E significativos para identificação de ortólogos. A consulta recíproca envolve pesquisa de detecções significativas contra uma base de dados de sequências de aminoácidos do organismo base que são semelhantes à sequência da proteína de pesquisa. Uma detecção é um ortólogo provável, quando o recíproco da melhor detecção é a própria proteína de pesquisa ou uma proteína codificada por um gene duplicado após especiação. Um outro aspecto da invenção compreende as proteínas homólogos funcionais que diferem num ou mais aminoácidos daqueles da proteína divulgada como resultado de substituições de aminoácidos conservativas, por exemplo, as substituições estão entre: aminoácidos ácidos (carregados negativamente) tais como ácido aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos básicos (carregados positivamente), tais como arginina, histidina e lisina; aminoácidos polares neutros tais como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, e glutamina; aminoácidos neutros não polares (hidrofóbicos), tais como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; aminoácidos possuindo cadeias laterais alifáticas, tais como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; aminoácidos com cadeias laterais alifáticas-hidroxilo, tais como serina e treonina; aminoácidos possuindo cadeias

laterais contendo amida tais como glutamina e asparagina; aminoácidos possuindo cadeias laterais aromáticas, tais como a fenilalanina, tirosina e triptofano; aminoácidos possuindo cadeias laterais básicas, tais como a lisina, arginina e histidina; aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo enxofre tais como a cisteína e metionina; aminoácidos naturalmente conservativos, tais como a valina-leucina, valina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutâmico, e asparagina-glutamina. Um outro aspecto dos homólogos codificados pelo ADN útil nas plantas transgênicas da presente invenção são aquelas proteínas que diferem de uma proteína divulgada como resultado da deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos numa sequência nativa.

Tal como aqui utilizado, "percentagem de identidade" significa o grau com que dois segmentos de ADN ou de proteína optimamente alinhados são invariantes ao longo de uma janela de alinhamento dos componentes, por exemplo, sequência de nucleótido, ou sequência de aminoácidos. Uma "fracção de identidade" para segmentos alinhados de uma sequência de ensaio e uma sequência de referência é o número de componentes idênticos que são partilhados pelas sequências dos dois segmentos alinhados dividido pelo número total de componentes no segmento da sequência de referência ao longo de uma janela de alinhamento, a qual é o menor da sequência de teste completa ou a sequência de referência completa. A "percentagem de identidade" ("% de identidade") é a fracção de identidade vezes 100.

Como usado aqui "Pfam" refere-se a uma grande colecção de alinhamentos de sequência múltiplas e modelos ocultos de Markov que cobrem muitas famílias proteína comuns, por exemplo, Pfam versão 18.0 (Agosto de 2005) contém alinhamentos e modelos para 7973 famílias de proteínas e baseia-se nas bases de dados de sequências de proteínas Swissprot 47.0 e SP-TrEMBL 30,0. Ver S.R. Eddy, "Profile Hidden Markov Models", Bioinformatics 14: 755-763, 1998. Pfam é actualmente mantida e actualizado por um Consórcio Pfam. Os alinhamentos representam alguma estrutura conservada evolutiva que tem implicações para a função da proteína. Perfis de modelos ocultos de Markov (perfis de HMM) construídos a partir dos alinhamentos Pfam são úteis para reconhecer automaticamente que uma nova proteína pertence a uma família de proteínas existentes, mesmo se a homologia por alinhamento parece ser baixa. Uma vez que um ADN é identificado como codificando para uma proteína que confere uma característica melhorada quando expresso em plantas transgénicas, outros ADN que codificam para proteínas da mesma família de proteínas são identificados por consulta à sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo ADN candidato contra o Modelo Oculto de Markov que caracteriza o domínio Pfam usando o software HMMER, uma versão actual do qual é fornecida na listagem de computador anexa. Proteínas candidatas que satisfazem o limite de encontro para o alinhamento de um determinado Pfam estão na família de proteína e possuem ADN cognato que é útil na construção de ADN recombinante para a

utilização nas células vegetais desta invenção. Bases de dados de Modelos Ocultos de Markov para utilização com o software HMMER na identificação de ADN que expressa a proteína num Pfam comum para ADN recombinante em células vegetais da presente invenção também estão incluídos na listagem de computador anexa. O software HMMER e bases de dados Pfam são da versão 18.0 e foram usados para determinar que a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 é caracterizada por dois domínios Pfam, isto é, domínio "Homeobox" e domínio HALZ. O domínio "Homeobox" foi identificado como contendo resíduos de aminoácidos entre as posições 130 e 193, com uma pontuação de 70,1 superando o limite de associação de -4. O domínio HALZ foi identificado como contendo resíduos de aminoácidos entre as posições 194 e 238, com uma pontuação de 71,9 superando limite reunião de 17.

O software e base de dados HMMER para identificar os domínios "Homeobox" e HALZ são acedidos em qualquer site de internet Pfam e podem ser fornecido pelo requerente, por exemplo, numa listagem de computador anexa.

Como usado aqui "promotor" significa ADN de regulação para inicializar a transcrição. Um "promotor vegetal" é um promotor capaz de iniciar a transcrição em células vegetais independentemente da sua origem ser ou não uma célula vegetal, por exemplo, é bem conhecido que os promotores de *Agrobacterium* são funcionais em células vegetais. Assim, os promotores de plantas incluem o

promotor do ADN obtido a partir de plantas, vírus de plantas e bactérias, tais como bactérias *Agrobacterium* e de *Bradyrhizobium*. Exemplos de promotores sob controlo do desenvolvimento incluem promotores que iniciam a transcrição preferencialmente em determinados tecidos, tais como folhas, raízes, ou sementes. Tais promotores são referidos como "de preferência para um tecido". Promotores que iniciam a transcrição apenas em certos tecidos são referidos como "específicos para um tecido". Um promotor específico para um "tipo de célula" dirige principalmente a expressão em certos tipos de células num ou mais órgãos, por exemplo, células vasculares em raízes ou folhas. Um promotor "indutível" ou "reprimível" é um promotor que está sob o controlo ambiental. Exemplos de condições ambientais que podem afectar a transcrição por promotores indutíveis incluem condições anaeróbias, ou certos químicos, ou a presença de luz. Promotores específicos de um tecido, com preferência para um tecido, específicos para um tipo de célula, e indutíveis constituem a classe de promotores "não constitutivos". Um promotor "constitutivo" é um promotor que actua na maioria das condições.

Tal como aqui utilizado "operativamente ligado" significa a associação de dois ou mais fragmentos de ADN numa construção de ADN de modo a que a função de um, por exemplo ADN que codifica para a proteína, é controlada pelo outro, por exemplo, um promotor.

Tal como aqui utilizado "expresso" significa

produzido, por exemplo, uma proteína é expressa numa célula vegetal quando o seu ADN cognato é transcrito para ARNm que é traduzido na proteína.

Tal como aqui utilizado uma "planta de controlo" significa uma planta que não contém o ADN recombinante que expressou uma proteína que confere uma característica melhorada. Uma planta de controlo é identificar e seleccionar uma planta transgénica que tem uma característica melhorada. Uma planta de controlo adequada pode ser uma planta não-transgénica da linha parental usada para gerar uma planta transgénica, ou seja, desprovida de ADN recombinante. Uma planta de controlo adequada pode nalguns casos ser uma descendência de uma linha de plantas transgénicas hemizigótica que não contém o ADN recombinante, conhecida como um segregante negativo.

Tal como aqui utilizado, um "rendimento melhorado" inclui um rendimento aumentado sob condições sem stress e um rendimento aumentado sob condições de stress ambiental. Condições de stress podem incluir, por exemplo, seca, sombra, doença fúngica, doença viral, doença bacteriana, infestação de insectos, infestação de nemátodos, exposição ao frio, exposição ao calor, stress osmótico, reduzida disponibilidade de nutrientes de azoto, reduzida disponibilidade de nutrientes de fósforo e elevada densidade de plantas. O "rendimento" pode ser afectado por muitas propriedades, incluindo, sem limitação, a altura da planta, número de vagens, a posição das vagens na planta,

número de entrenós, a incidência da quebra da vagem, o tamanho de grão, a eficiência da nodulação e fixação de azoto, a eficiência de assimilação de nutrientes, resistência a stress biótico e abiótico, a assimilação de carbono, arquitectura da planta, resistência ao acamamento, percentagem de germinação de sementes, vigor de plântulas, e as características dos juvenis. O rendimento pode também afectado pela eficiência de germinação (incluindo a germinação em condições de stress), a taxa de crescimento (incluindo taxa de crescimento em condições de stress), número de espigas, número de sementes por espiga, tamanho da semente, composição da semente (amido, óleo, proteína) e as características de enchimento das sementes.

O aumento da produção de uma planta transgénica da presente invenção pode ser medido de várias maneiras, incluindo o teste do peso, o número de sementes por planta, peso de sementes, o número de sementes por unidade de área (isto é, sementes, ou o peso de sementes, por acre), "bushels" por acre (bu/a), toneladas por hectare, toneladas por hectare, quilo por hectare. Por exemplo, o rendimento do milho pode ser medido como a produção de grãos de milho com casca por unidade de área de produção, por exemplo, em "bushels" por acre ou toneladas por hectare, muitas vezes apresentados numa base ajustada para a humidade, por exemplo, a 15,5 por cento de humidade. O aumento do rendimento pode resultar de uma melhor utilização de compostos bioquímicos importantes, como azoto, fósforo e hidratos de carbono, ou de respostas melhoradas a stresses

ambientais, tais como frio, calor, seca, concentração de sal e ataque de pragas ou patogénios. O ADN recombinante utilizado na presente invenção também pode ser utilizado para proporcionar plantas com uma melhoria do crescimento e desenvolvimento, e, finalmente, o aumento de rendimento, como o resultado de expressão modificado de reguladores de crescimento de plantas ou a alteração do ciclo celular ou vias fotossintéticas. Também de interesse é a geração de plantas transgénicas que apresentam um rendimento acrescido em relação a um componente de semente que pode corresponder ou não a um aumento no rendimento global da planta. Tais propriedades incluem melhorias no óleo de semente, moléculas das sementes, tais como tocoferol, proteína e amido, ou os componentes do óleo particulares tais como se podem manifestar por uma alteração nas proporções dos componentes da semente.

Um subconjunto das moléculas nucleicas inclui fragmentos do ADN recombinante divulgado que consiste em oligonucleótidos de pelo menos 15, de preferência, pelo menos, 16 ou 17, mais preferencialmente, pelo menos, 18 ou 19, e ainda mais preferivelmente pelo menos 20 ou mais, nucleótidos consecutivos. Tais oligonucleótidos são fragmentos de moléculas maiores com uma sequência de SEQ ID NO: 1, e encontram uso, por exemplo, como sondas e iniciadores para a detecção dos polinucleótidos aqui descritos.

As construções de ADN são montadas usando métodos

bem conhecidos das pessoas com conhecimentos normais na técnica e compreendem tipicamente um promotor operativamente ligado ao ADN, cuja expressão fornece a característica agronómica melhorada. Outros componentes de construção podem incluir elementos reguladores adicionais, tais como líderes 5' e intrões para aumentar a transcrição, regiões 3' não traduzidas (tais como sinais e locais de poliadenilação), ADN para trânsito ou peptídeos sinal.

Numerosos promotores que são activos nas células vegetais têm sido descritos na literatura. Estes incluem os promotores presentes nos genomas de plantas, bem como os promotores provenientes de outras fontes, incluindo o promotor da nopalina sintetase (NOS) e o promotor de octopina sintetase (OCS) presentes em plasmídeos indutores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, promotores caulimovirus tais como o vírus do mosaico da couve flor (CaMV35S). Patente U.S. 5,641,876, que divulga um promotor de actina de arroz, U.S. 2002/0192813A1, que divulga elementos 5', 3' e intrões úteis na concepção de vectores de expressão eficientes de plantas, U.S. 2004/0216189 que descreve um promotor aldolase de cloroplasto de milho, U.S. 2004/0216189, que divulga um promotor da aldolase de milho (FDA), e U.S. 2003/0131377 que divulga um promotor nicotianamina sintase de milho. Estes e muitos outros promotores que funcionam em células vegetais são conhecidos dos peritos na arte e estão disponíveis para uso em polinucleótidos recombinantes da presente invenção para

proporcionar a expressão de genes desejados em células vegetais transgênicas.

Noutros aspectos da invenção, a expressão preferencial em tecidos verdes de plantas é desejada. Os promotores de interesse para tais utilizações incluem aquelas de genes, tais como a subunidade pequena de carboxilase de ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco) de *Arabidopsis thaliana*, (Fischhoff et al. (1992) *Plant Mol Biol.* 20: 81-93), aldolase e piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) (Taniguchi et al (2000) *Plant Cell Physiol.* 41(1): 42-48).

Além disso, os promotores podem ser alterados para conter múltiplas "sequências potenciadoras" para ajudar a elevar a expressão do gene. Tais potenciadores são conhecidos na técnica. Com a inclusão de uma sequência potenciadora com tais construções, a expressão da proteína seleccionada pode ser aumentada. Estes potenciadores são frequentemente encontrados a 5' em relação ao início da transcrição num promotor que funciona em células eucarióticas, mas muitas vezes pode ser inserido a montante (5') ou a jusante (3') da sequência de codificação. Nalguns casos, estes elementos potenciadores 5' são intrões. Particularmente úteis como potenciadores são intrões a 5' da actina 1 de arroz (ver Patente U.S. 5,641,876) e dos genes da actina 2 de arroz, o intrão do gene da álcool desidrogenase do milho, o intrão do gene da proteína 70 de choque térmico de milho (Patente U.S. 5,593,874) e o gene encolhido 1 de milho.

Noutros aspectos da invenção, deseja-se que a expressão suficiente em tecidos de sementes de plantas efectue melhorias na composição de sementes. Exemplos de promotores para a utilização para a modificação da composição de sementes incluem promotores de genes de sementes, tais como napina (U.S. 5,420,034), oleosina L3 de milho (EUA 6,433,252), zeína Z27 (Russell et al. (1997) Transgenic Res. 6(2): 157-166), globulina 1 (Belanger et al (1991) Genetics 129: 863-872), glutelina 1 (Russell (1997) *supra*), e peroxirredoxina antioxidante (Per1) (Stacy et al. (1996) Plant Mol Biol. 31 (6): 1205-1216). As construções de ADN recombinante preparadas de acordo com a invenção também irão geralmente incluir um elemento 3' que normalmente contém um sinal e local de poliadenilação. Elementos 3' bem conhecidos incluem os genes de *Agrobacterium tumefaciens*, tais como *nos 3'*, *tml 3'*, *tmr 3'*, *tms 3'*, *ocs 3'*, *tr7 3'*, por exemplo, divulgado em U.S. 6,090,627; elementos 3' de genes de plantas tais como trigo (*Triticum aestivum*), proteína de choque térmico 17 (*Hsp17 3'*), um gene de ubiquitina de trigo, um gene da frutose-1,6-bifosfatase de trigo, um gene da glutelina de arroz, um gene da lactato desidrogenase de arroz e um gene da beta-tubulina de arroz, os quais são divulgados em U.S. 2002/0192813; e o da gene ribulose bifosfato carboxilase (*rbs 3'*) de ervilha (*Pisum sativum*), e elementos 3' dos genes na planta hospedeira.

As construções e os vectores podem também incluir

um péptido de trânsito para o direcionamento de um gene-alvo para um organelo de planta, particularmente para um cloroplasto, leucoplasto ou outro organelo plastídeo. Para descrições da utilização de péptidos de trânsito dos cloroplastos ver Patentes U.S. 5,188,642 e 5,728,925. Para a descrição da região do péptido de trânsito de um gene de EPSPS de *Arabidopsis* útil na presente invenção, ver Klee, H.J. et al (MGG (1987) 210: 437-442).

As plantas transgênicas que compreendem ou que são derivadas de células vegetais da presente invenção transformadas com ADN recombinante podem ser ainda mais melhoradas com características acumuladas, por exemplo uma planta de cultivo que tem uma característica melhorada resultante da expressão de ADN aqui divulgada em combinação com características de resistência a herbicidas e/ou às pragas. Por exemplo, os genes aqui descritos podem ser combinados com outras características de interesse agronômico, tais como uma característica que proporciona resistência a um herbicida, ou resistência a insectos, tais como a utilização de um gene de *Bacillus thuringensis* para proporcionar resistência contra lepidópteros, coliópteros, homópteros, hemiópteros, e outros insectos. Herbicidas para os quais a tolerância da planta transgênica tem sido demonstrada e o método da presente invenção podem ser aplicados incluem, mas não estão limitados a, herbicidas glifosato, dicamba, glufosinato, sulfonilureia, bromoxinilo e norflurazon. Moléculas de polinucleótido que codificam para proteínas envolvidas na tolerância a herbicidas são

bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, uma molécula de polinucleótido que codifica para 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) divulgados nas Patentes U.S. 5,094,945; 5,627,061; 5,633,435 e 6,040,497 para conferir tolerância ao glifosato; moléculas de polinucleótido que codificam para uma oxidorreductase de glifosato (GOX), divulgada na Patente U.S. 5,463,175 e uma glifosato-N-acetil transferase (GAT) descrita em U.S. 2003/0083480, também para conferir tolerância ao glifosato; dicamba monoxigenase divulgada em U.S. 2003/0135879 de conferir tolerância a dicamba; uma molécula de polinucleótido codificando para bromoxinil nitrilase (*Bxn*) divulgados na Patente U.S. 4,810,648 para conferir tolerância bromoxinil; uma molécula de polinucleótido codificando para fitoeno dessaturase (*ctrI*) descrita em Misawa et al, (1993) Plant J. 4: 833-840 e Misawa et al, (1994) Plant J. 6: 481-489 para a tolerância norflurazona; uma molécula de polinucleótido que codifica para aceto-hidroxiácido sintase (AHAS, ou seja ALS) descrita em Sathasiivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 2188-2193 para conferir a tolerância a herbicidas sulfonilureias; moléculas polinucleotídicas conhecidas como genes *bar* divulgadas em DeBlock, et al. (1987) EMSO J. 6: 2513-2519 para conferir tolerância ao glufosinato e a bialafos; moléculas polinucleotídicas divulgadas em U.S. 2003/010609 para conferir tolerância ao ácido N-amino metil fosfônico; moléculas polinucleotídicas divulgadas na Patente U.S. 6,107,549 para conferir resistência a herbicidas de piridina; moléculas e métodos para conferir

tolerância a herbicidas múltiplos, tais como glifosato, atrazina, inibidores de ALS, e herbicidas isoxoflutole e glufosinato são descritos em Patente U.S. 6,376,754 e U.S. 2002/0112260. As moléculas e métodos para conferir resistência a insectos/nemátodos/vírus estão descritos nas patentes U.S. 5,250,515; 5,880,275; 6,506,599; 5,986,175 e U.S. 2003/0150017. Em formas de realização particulares, os inventores contemplam a utilização de anticorpos, quer monoclonais ou policlonais que se ligam às proteínas aqui divulgadas. Métodos para a preparação e caracterização de anticorpos são bem conhecidos na técnica (Ver, por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Os métodos para a geração de anticorpos monoclonais (mAbs) geralmente começam ao longo das mesmas linhas que aqueles para a preparação de anticorpos policlonais. Resumidamente, um anticorpo policlonal é preparado por imunização de um animal com uma composição imunogénica de acordo com e recolha do anti-soro desse animal imunizado. Uma grande variedade de espécies animais pode ser utilizado para a produção de anti-soros. Normalmente o animal utilizado para a produção de anti-soros é um coelho, um rato, um rato, um hamster, um porquinho da índia ou uma cabra. Devido ao volume relativamente grande de sangue dos coelhos, um coelho é uma escolha preferida para a produção de anticorpos policlonais.

Como é bem conhecido na técnica, uma determinada composição pode variar na sua imunogenicidade. Muitas vezes, é necessário, por conseguinte, reforçar o sistema

imunitário do hospedeiro, conforme pode ser conseguido através do acoplamento de um péptido ou polipéptido imunogénico a um transportador. Transportadores exemplificativos e preferidos são hemocianina da lapa gigante (KLH) e a albumina sérica bovina (BSA). Outras albuminas tais como a ovalbumina, albumina de soro de rato ou albumina de soro de coelho podem ser também utilizadas como transportadores. Meios para conjugar um polipéptido com uma proteína veículo são bem conhecidos na técnica e incluem a utilização de glutaraldeído, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida, carbodi-imida e benzidina bis-biazotizada.

Como também é bem conhecido na técnica, a imunogenicidade de uma composição de imunogénio particular pode ser aumentada através da utilização de estimuladores não específicos da resposta imunitária, conhecidos como adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos e preferidos incluem o adjuvante completo de Freund (um estimulador não-específico da resposta imunitária contendo *Mycobacterium tuberculosis* mortas), os adjuvantes incompletos de Freund e adjuvante de hidróxido de alumínio.

A quantidade de composição de imunogénio usada na produção de anticorpos policlonais varia com a natureza do imunogénio assim como do animal usado para imunização. Uma variedade de vias pode ser utilizada para administrar o imunogénio (subcutânea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). A produção de anticorpos policlonais pode ser monitorizada por amostragem do sangue

do animal imunizado em vários pontos a seguir à imunização. Uma segunda injeção, de reforço, também pode ser dada. O processo de reforço e titulação é repetido até que um título adequado seja conseguido. Quando o nível desejado de imunogenicidade é obtido, o animal imunizado pode ser sangrado e o soro isolado e armazenado, e/ou o animal pode ser usado para gerar mAbs.

mAbs podem ser prontamente preparados através da utilização de técnicas bem conhecidas, tais como aquelas exemplificadas na Patente U.S. No. 4,196,265. Tipicamente, esta técnica envolve a imunização de um animal adequado com uma composição imunogénica seleccionada, por exemplo, uma proteína, polipéptido ou péptido antifúngico purificado ou parcialmente purificado. A composição imunizante é administrada de forma eficaz para estimular as células produtoras de anticorpos. Roedores tais como ratinhos e ratos são animais preferidos, no entanto, o uso de células de coelho, ovelha, ou de rã é também possível. A utilização de ratos pode fornecer certas vantagens (Goding, 1986, pp. 60-61), mas são preferidos ratinhos, sendo o ratinho BALB/c o mais preferido pois é o mais rotineiramente usado e geralmente dá uma percentagem mais elevada de fusões estáveis.

A seguir à imunização, as células somáticas com o potencial para produzir anticorpos, especificamente linfócitos B (células B), são seleccionadas para utilização no protocolo de geração de mAb. Estas células podem ser

obtidas a partir de baços, amígdalas ou nodos linfáticos biopsiados, ou a partir de uma amostra de sangue periférico. As células do baço e células do sangue periférico são as preferidas, as primeiras porque são uma fonte rica de células produtoras de anticorpos que estão na fase de divisão plasmablasto, e a última porque o sangue periférico é facilmente acessível. Muitas vezes, um painel de animais terá sido imunizado e o baço do animal com o maior título de anticorpos será removido e os linfócitos do baço obtidos por homogeneização do baço com uma seringa. Tipicamente, um baço de um ratinho imunizado contém aproximadamente 5×10^7 a 2×10^8 linfócitos.

Os linfócitos B produtores de anticorpos do animal imunizado são depois fundidos com células de uma célula imortal de mieloma, geralmente uma da mesma espécie que o animal que foi imunizado. Linhas de células de mieloma adequadas para utilização em procedimentos de fusão produtores de hibridoma são preferencialmente não produtoras de anticorpos, têm elevada eficiência de fusão, e deficiências enzimáticas que as tornam incapazes de crescer em certos meios selectivos que suportam o crescimento de apenas as células fundidas desejadas (hibridomas).

Qualquer uma de um número de células de mieloma podem ser utilizadas, tal como é conhecido pelos peritos na técnica (Goding, 1986, pp. 65-66; Campbell, 1984, pp. 75-83). Por exemplo, quando o animal imunizado é um ratinho, pode-se utilizar P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1,

SP210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 e S194/5XX0 Bul; para ratos, pode-se utilizar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F e 4B210; e U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 e UC729-6 são úteis em relação a fusão de células humanas.

Uma célula de mieloma murina preferida é a linha celular de mieloma NS-1 (também denominada P3-NS-1-Ag4-1), que está facilmente disponível a partir do NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, solicitando a linha celular com o número de repositório GM3573. Outra linha de células de mieloma de ratinho que pode ser usada é a linha celular não produtora SP2/0 de mieloma murino de rato resistente à 8-azaguanina. Os métodos para gerar híbridos de células de mieloma e células de baço ou de nódulos linfáticos produtoras de anticorpos usualmente compreendem a mistura de células somáticas com células de mieloma na proporção de 2:1, embora a proporção possa variar de cerca de 20:1 a cerca de 1:1, respectivamente, na presença de um agente ou agentes (químicos ou eléctricos) que promovam a fusão de membranas celulares. Métodos de fusão utilizando vírus Sendai foram descritos (Kohler e Milstein, 1975; 1976), e aqueles que usam polietilenoglicol (PEG), tal como 37% (v/v) de PEG, (Gefter et al, 1977.). O uso de métodos de fusão induzidos electricamente é igualmente adequado (Goding, 1986, pp 71-74).

Procedimentos de fusão geralmente produzem híbridos viáveis em baixas frequências, de 1×10^{-6} a $1 \times$

10^{-8} . No entanto, isto não coloca um problema, pois os híbridos fundidos viáveis são diferenciados das células não fundidas parentais (particularmente das células de mieloma não fundidas que normalmente continuariam a dividir-se indefinidamente) por cultura num meio selectivo. O meio selectivo é geralmente um que contém um agente que bloqueia a síntese *de novo* de nucleótidos nos meios de cultura de tecidos. Agentes exemplificativos e preferidos são a aminopterina, metotrexato, e azasserina. A aminopterina e o metotrexato bloqueiam a síntese *de novo* de ambas as purinas e as pirimidinas, enquanto que a azasserina bloqueia apenas a síntese de purinas. Quando se utiliza a aminopterina ou o metotrexato, o meio é complementado com hipoxantina e timidina como fonte de nucleótidos (meio HAT). Quando se utiliza a azasserina, o meio é suplementado com hipoxantina.

O meio de selecção preferido é HAT. Apenas células capazes de operar vias de recuperação de nucleótidos são capazes de sobreviver em meio HAT. As células de mieloma são deficientes em enzimas chave da via de recuperação, por exemplo, hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT), e não conseguem sobreviver. As células B podem operar esta via, mas têm uma vida útil limitada em cultura e geralmente morrem após aproximadamente duas semanas. Por conseguinte, as únicas células que podem sobreviver no meio selectivo são aqueles híbridos formados a partir de mieloma e células B.

Esta cultura fornece uma população de hibridomas

a partir da qual são seleccionados hibridomas específicos. Tipicamente, a selecção de hibridomas é realizada por cultura de células por diluição de um único clone em microplacas, seguida de teste dos sobrenadantes clonais individuais (após cerca de duas a três semanas) para a reactividade desejada. O ensaio deve ser sensível, simples e rápido, tal como radioimunoensaios, imunoensaios enzimáticos, ensaios de citotoxicidade, ensaios de placa, ensaios de imunoligação.

Os hibridomas seleccionados seriam então ser diluídos em série e clonados em linhas celulares individuais produtoras de anticorpos, cujos clones podem ser propagados indefinidamente para fornecer mAbs. As linhas celulares podem ser exploradas para produção de mAb em duas formas básicas. Uma amostra do hibridoma pode ser injectada (muitas vezes na cavidade peritoneal) num animal histocompatível do tipo que foi utilizado para fornecer as células somáticas e de mieloma para a fusão inicial. O animal injectado desenvolve tumores que secretam o anticorpo monoclonal específico produzido pelo híbrido de células fundidas. Os fluidos corporais do animal, tais como soro ou fluido ascítico, podem então ser recolhidos para fornecer mAbs em concentrações elevadas. As linhagens de células individuais também poderiam ser criadas em cultura *in vitro*, onde os mAbs são naturalmente secretados para o meio de cultura a partir do qual podem ser facilmente obtidos em elevadas concentrações. mAbs produzidos por qualquer destes meios podem ser ainda purificados, se

desejado, utilizando filtração, centrifugação e vários métodos cromatográficos tais como HPLC ou cromatografia de afinidade.

Métodos de Transformação de Células Vegetais

São conhecidos na técnica numerosos métodos de transformação de células vegetais com ADN recombinante e podem ser utilizados na presente invenção. Dois métodos vulgarmente utilizados para a transformação de plantas são a transformação mediada por *Agrobacterium* e de bombardeamento de microprojecteis. Métodos de bombardeamento de microprojecteis estão ilustrados nas patentes US 5,015,580 (soja); 5,550,318 (milho); 5,538,880 (milho); 5,914,451 (soja); 6,160,208 (milho); 6,399,861 (milho) e 6,153,812 (trigo) e a transformação mediada por *Agrobacterium* está descrita na Patente U.S. 5,159,135 (algodão); 5,824,877 (soja); 5,591,616 (milho); e 6,384,301 (soja). Para sistemas de transformação de plantas baseados em *Agrobacterium tumefaciens*, elementos adicionais presentes em construções de transformação incluem sequências de flanqueio à esquerda e à direita de T-DNA para facilitar a incorporação do polinucleótido recombinante no genoma da planta.

Em geral, é útil introduzir o ADN recombinante de forma aleatória, isto é, numa localização não-específica, no genoma de uma linha de planta alvo. Em casos especiais, pode ser útil direccionar a inserção de ADN recombinante, de modo a obter uma integração específica de um local, por

exemplo, para substituir um gene existente no genoma, para usar um promotor existente no genoma da planta, ou para inserir um polinucleótido recombinante numa local predeterminado conhecido por ser activo para a expressão de genes. Existem vários sistemas de recombinação específicos do local que se sabe funcionarem em plantas e incluem cre-lox, como divulgado na Patente U.S. 4,959,317 e FLP-FRT como divulgado na Patente U.S. 5,527,695. Os métodos de transformação da presente invenção são de preferência praticados em cultura de tecidos em meios de comunicação e num ambiente controlado. "Meio" refere-se às várias misturas de nutrientes que são usados para cultivar as células *in vitro*, ou seja, fora do organismo vivo intacto. Células alvo receptoras incluem, mas não se limitam a, células do meristema, calos, células de embriões imaturos e células dos gâmetas, tais como micrósporos, pólen, esperma e células de ovos. Considera-se que qualquer célula a partir da qual uma planta fértil pode ser regenerada é útil como uma célula receptora. O calo pode ser iniciado a partir de fontes de tecidos, incluindo, mas não limitadas a, embriões imaturos, meristemas apicais de plântulas, micrósporos e semelhantes. Células capazes de proliferar como calos também são células receptoras para a transformação genética. Métodos de transformação práticos e materiais para tornar as plantas transgênicas da presente invenção, por exemplo vários meios e as células alvo receptoras, a transformação de células de embriões imaturos e subsequente regeneração de plantas transgênicas férteis, são divulgados nas Patentes U.S. 6,194,636 e 6,232,526.

As sementes de plantas transgénicas podem ser colhidas a partir de plantas transgénicas férteis e ser usado para crescer gerações de descendência de plantas transformadas desta invenção incluindo linhas de plantas híbridas para selecção de plantas que têm uma característica melhorada. Além da transformação directa de uma planta com um ADN recombinante, as plantas transgénicas podem ser preparadas por cruzamento de uma planta que tem um primeiro ADN recombinante com uma segunda planta à qual falta o ADN. Por exemplo, o ADN recombinante pode ser introduzido na primeira linha de planta que é susceptível à transformação para produzir uma planta transgénica que pode ser cruzada com uma segunda linha de planta para introduzir o ADN recombinante na segunda linha de planta. Uma planta transgénica com ADN recombinante que fornece uma característica melhorada, por exemplo, um rendimento melhorado, pode ser cruzada com uma linha de planta transgénica com outro ADN recombinante que confere uma outra característica, por exemplo, resistência a herbicidas ou resistência a pragas, para produzir plantas descendentes possuindo ADN recombinante que confere ambas as características. Normalmente, tal melhoramento de plantas para combinação de características, a planta transgénica que doa a característica adicional é uma linha masculina e a planta transgénica com as características de base é a linha feminina. A descendência deste cruzamento vai segregar de tal forma que algumas das plantas vão conter o ADN de ambos as características parentais e algumas vão

conter ADN para uma característica parental; essas plantas podem ser identificadas por meio de marcadores associados com o ADN recombinante parental, por exemplo, a identificação do marcador por análise de ADN recombinante, ou, no caso em que um marcador de selecção está ligado ao recombinante, por aplicação do agente de selecção tal como um herbicida para uso com um marcador de tolerância a herbicidas, ou através de selecção pela característica melhorada. Plantas descendentes com o ADN para ambas as características parentais podem ser cruzadas de volta para a linha progenitora feminina várias vezes, por exemplo, geralmente, 6 a 8 gerações, para produzir uma planta de descendência com substancialmente o mesmo genótipo que uma linha parental transgénica original, excepto para o ADN recombinante da outra linha parental transgénica.

Na prática da transformação, o ADN é tipicamente introduzido apenas numa pequena percentagem de células vegetais alvo em qualquer experiência de transformação. Genes marcadores são usados para fornecer um sistema eficiente para a identificação das células que são transformadas de forma estável, recebendo e integrando uma construção de ADN transgénico nos seus genomas. Os genes marcadores preferidos fornecem marcadores selectivos que conferem resistência a um agente selectivo, tal como um antibiótico ou herbicida. Qualquer um dos herbicidas a que as plantas deste invento podem ser resistentes são agentes úteis para marcadores selectivos. Células potencialmente

transformadas são expostas ao agente selectivo. Na população de células sobreviventes serão aquelas células em que, geralmente, o gene que confere resistência é integrado e expresso em níveis suficientes para permitir a sobrevivência das células. As células podem ser testadas ainda para confirmar a integração estável do ADN exógeno. Genes marcadores selectivos comumente usados incluem aqueles que conferem resistência a antibióticos como canamicina e paromomicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) e gentamicina (*aac3* e *aacC4*) ou resistência a herbicidas, como o glufosinato (*bar* ou *pat*) e glifosato (*aroA* ou EPSPS). Exemplos de tais seleccionáveis são ilustrados nas Patentes U.S. 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 e 6,118,047. Marcadores seleccionáveis que proporcionam uma capacidade para identificar visualmente os transformantes podem também ser empregues, por exemplo, um gene que expressa uma proteína colorida ou fluorescente, tal como uma luciferase ou proteína verde fluorescente (GFP) ou um gene que expressa uma *beto*-glucuronidase ou gene *uidA* (GUS) para o que se conhecem vários substratos cromogénicos.

As células vegetais que sobrevivem à exposição ao agente selectivo, ou células vegetais que tenham sido classificadas positivas num ensaio de rastreio, podem ser cultivadas em meio de regeneração e deixadas amadurecer em plantas. Plântulas em desenvolvimento regeneradas a partir de células vegetais transformadas podem ser transferidas para a mistura de crescimento de plantas, e aclimatizadas,

por exemplo, numa câmara de ambiente controlado a cerca de 85% de humidade relativa, 600 ppm de CO₂, e 25-250 microeinstein m⁻²s⁻¹ de luz, antes da transferência para uma estufa ou câmara de crescimento para a maturação. As plantas são regeneradas durante cerca de 6 semanas a 10 meses após se identificar um transformante, dependendo do tecido inicial. As plantas podem ser polinizadas usando métodos convencionais de reprodução de plantas conhecidas dos peritos na técnica e sementes produzidas, por exemplo, a autopolinização é vulgarmente usada com o milho transgénico. A planta transformada regenerada ou as suas sementes ou plantas descendentes podem ser testadas para a expressão do ADN recombinante e seleccionadas para a presença da característica agronómica melhorada.

Plantas e Sementes Transgénicas

Plantas transgénicas derivadas a partir das células vegetais de milho desta invenção são cultivadas para produzir plantas transgénicas com uma característica melhorada, em comparação com uma planta de controlo e produzir sementes transgénicas e pólen haplóide desta invenção. Tais plantas com características melhoradas são identificadas por selecção de plantas transformadas ou sementes de descendência para a característica melhorada. Para a eficiência é concebido um método de selecção para avaliar múltiplas plantas transgénicas (eventos) que compreendem o ADN recombinante, por exemplo, múltiplas plantas com 2 a 20 ou mais eventos transgénicos. As plantas

transgênicas cultivadas a partir de sementes transgênicas aqui fornecidas demonstram características agronômicas melhoradas que contribuem para o aumento do rendimento ou outra característica que proporciona maior valor da planta, incluindo, por exemplo, a melhoria da qualidade das sementes. De particular interesse são plantas com maior eficiência no uso da água, melhor tolerância ao frio, maior rendimento, melhor rendimento, maior eficiência de uso de azoto, proteína da semente aumentada e óleo de semente aumentado.

A Tabela 1 fornece uma lista de ADN que codifica para uma proteína ("genes") que são úteis como ADN recombinante para a produção de plantas transgênicas com características agronômicas melhoradas, os elementos da Tabela 1 são descritos por referência a:

"PEP SEQ", que identifica uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

"NUC SEQ", que identifica uma sequência de ADN de SEQ ID NO: 1.

"Vector de base" que identifica um plasmídeo de base utilizado para a transformação do ADN recombinante.

"NOME DA PROTEÍNA", que é um nome comum para a proteína codificada pelo ADN recombinante.

"ID do plasmídeo", que identifica um nome arbitrário para o plasmídeo de transformação de plantas que compreende o ADN recombinante para expressar o ADN recombinante em células vegetais.

Tabela 1

PEP SEQ ID NO	NUC SEQ ID NO	Vector Base	NOME DA PROTEÍNA	ID do Plasmídeo
5	1	pMON65154	Arabidopsis G1543	pMON68392
5	1		Arabidopsis G1543	pMON74775
5	1	pMON74537	Arabidopsis G1543	pMON83062

Métodos de rastreio para plantas transgénicas com rendimento melhorado

Muitos eventos transgénicos que sobrevivem a plantas transgénicas férteis que produzem sementes e plantas de descendência não irão apresentar uma característica agronómica melhorada. O rastreio é necessário para identificar a planta transgénica desta invenção. Plantas transgénicas com características agronómicas melhoradas são identificados a partir de populações de plantas transformadas tal como aqui descrito, através da avaliação do rendimento numa variedade de ensaios para detectar um rendimento melhorado. Estes ensaios também podem assumir muitas formas, incluindo, mas não limitado a, a análise para detectar mudanças na sua composição química, a biomassa, propriedades fisiológicas, morfologia da planta. Alterações na composições química tais como a composição nutricional dos grãos pode ser detectada por meio de análise da composição da semente e do teor de proteínas, aminoácidos livres, óleos, ácidos gordos livres, amido ou tocoferóis. Alterações nas características de biomassa

podem ser realizadas plantas cultivadas em estufa ou no campo e podem incluir a altura da planta, diâmetro do caule, pesos secos da raiz e dos rebentos; e, para as plantas de milho, comprimento e diâmetro da espiga. Alterações nas propriedades fisiológicas podem ser identificadas através da avaliação de respostas a condições de stress, por exemplo, ensaios utilizando condições de stress impostas, tais como défice hídrico, a deficiência de azoto, condições de crescimento a baixas temperaturas, ataque de patogénios ou de insectos ou deficiência de luz, ou aumento da densidade das plantas. Alterações na morfologia podem ser medidas através da observação visual da tendência de uma planta transformada com uma característica agronómica melhorada parecer ser também uma planta normal em comparação com as mudanças relativamente a folhas mais altas, mais grossas, mais estreitas, folhas listradas, evidência de nós, clorose, albina, produção de antocianinas, ou bandeiras, espigas ou raízes alteradas. Outras propriedades para rastreio incluem dias para a polinização, dias para florescimento, a taxa de alongamento foliar, teor de clorofila, temperatura da folha, suporte, vigor de plântulas, comprimento dos entrenós, altura da planta, número de folhas, área foliar, perfilhamento, raízes aéreas, manutenção da cor verde, acamamento do caule, acamamento da raiz, fitossanidade, infertilidade/fertilidade, quebra do caule pelo vento e resistência a pragas. Além disso, características fenotípicas de grãos colhidos podem ser avaliadas, incluindo o número de grãos por fileira da espiga, número de fileiras de grãos na espiga, aborto do

grão, peso dos grãos, tamanho do grão, densidade do grão e qualidade física dos grãos.

Sementes para plantas transgênicas com características agronômicas melhoradas desta invenção são plantas de milho.

Rastreio para Rendimento Melhorado

Muitas plantas transgênicas desta invenção apresentam um melhor rendimento em comparação com uma planta controle. Rendimento melhorado pode resultar do aumento da massa potencial da semente, isto é, o número e tamanho das células do endosperma ou núcleos e/ou massa aumentada, isto é, a taxa de biossíntese de amido. O potencial de aumento de massa pode ser estabelecido muito precocemente durante o desenvolvimento do grão, uma vez que o número de células do endosperma e tamanho das célula são determinados nos primeiros dias após a polinização.

A maior parte do aumento do rendimento do milho das últimas décadas resultou de um aumento na densidade de plantio. Durante esse período, o rendimento do milho tem vindo a aumentar a um ritmo de 29,91/ha/ano (2,1 "bushels"/acre/ano), mas a densidade de plantio aumentou a uma taxa de 618 plantas/ha/ano (250 plantas/acre/ano). Uma característica do milho híbrido moderno é a capacidade destas variedades de serem plantadas em alta densidade. Muitos estudos têm demonstrado que uma densidade de plantio

superior à actual deverá resultar numa maior produção de biomassa, mas o germoplasma actual não funciona bem a estas densidades mais elevadas. Uma abordagem para o aumento de rendimento é aumentar o índice de colheita (HI), a proporção de biomassa que é alocada ao grão em relação à biomassa total, em plantios de alta densidade.

O rastreio eficaz do rendimento de milho transgénico usa uma descendência híbrida do evento transgénico ao longo de vários locais com plantas cultivadas sob práticas óptimas de gestão da produção e controlo máximo de pragas. Um alvo útil para o rendimento melhorado é um aumento de 5% a 10% no rendimento em comparação com o rendimento produzido por plantas cultivadas a partir de sementes de uma planta de controlo. O rastreio útil em múltiplas e diversas localizações geográficas, por exemplo, até 16 ou mais localizações, ao longo de uma ou mais estações de plantio, por exemplo, pelo menos duas estações de plantio para distinguir estatisticamente a melhoria de rendimento dos efeitos ambientais naturais. Plantam-se várias plantas transgénicas, plantas de controlo positivo e negativo, e plantas polinizadoras em parcelas padrão, por exemplo, duas parcelas em filas, com 6,1 m (20 pés) de comprimento por 1,5 m (5 pés) metros de largura, com 76 cm (30 polegadas) de distância entre as filas e uma alameda de 91 cm (3 pés) entre as fileiras. Acontecimentos transgénicos podem ser agrupados por construções de ADN recombinante com grupos colocados aleatoriamente no campo. Uma parcela polinizadora de uma linha de milho de alta quali-

dade é plantada em cada duas parcelas para permitir a polinização aberta ao usar eventos transgênicos estéreis masculinos. Uma densidade de plantio útil é de cerca de 74100 plantas/ha (30000 plantas/acre).

Indicadores sucedâneos para o rastreio para a melhoria de rendimento incluem a capacidade de fonte (biomassa), a produção da fonte (sacarose e fotossíntese), os componentes da massa (tamanho do grão, o tamanho da espiga, amido na semente), o desenvolvimento (resposta à luz, a altura, a tolerância à densidade), maturidade, característica de floração precoce e respostas fisiológicas ao plantio de alta densidade, por exemplo, a 111200 plantas/ha (45.000 plantas por acre), por exemplo, tal como ilustrado na Tabela 2. Quando se rastreia para um rendimento melhorado uma abordagem de medição estatística útil compreende três componentes, ou seja, a modelação de auto-correlação espacial do campo de teste em separado para cada local, ajustando características de eventos de ADN recombinante para a dependência espacial para cada local, e a realização de uma análise ao longo das localizações. O primeiro passo na modelação da auto-correlação espacial é estimar os parâmetros de covariância do semivariograma. Um modelo de covariância esférica é assumido para modelar a auto-correlação espacial. Devido à dimensão e à natureza do ensaio, é provável que a correlação espacial possa mudar. Por isso, a anisotropia também é assumida juntamente com a estrutura de covariância esférica.

Tabela 2

Tempo	Avaliação	Descrição	Comentários
V2-3	Posição precoce	Pode ser aferido em qualquer altura após a germinação e antes da remoção de quaisquer plantas.	
Polinização	GDU a 50% de libertação	GDU a 50% de plantas libertando 50% bandeira.	
Produção do estigma	GDU a 50% de estigma	GDU a 50% das plantas que apresentam estigma.	
Maturidade	Altura da planta	Altura desde a superfície do solo até à ligação da folha de topo (polegadas)	10 plantas por parcela - Assistência da equipa de rendimento
Maturidade	Altura da espiga	Altura da superfície do solo ao nodo de ligação primário da espiga	10 plantas por parcela - Assistência da equipa de rendimento
Maturidade	Folhas acima da espiga	Pontuação visual: erectas, tamanho, enrolamento	
Maturidade	Tamanho da bandeira	Pontuação visual: +/- vs. nativo	
Pré-colheita	Posição final	Contagem da posição final antes da colheita, excluem-se renovos	
Pré-colheita	Acamamento do caule	No. de caules partidos abaixo da ligação da espiga primária. Excluem-se renovos.	
Pré-colheita	Acamamento da raiz	No- de caules com um ângulo >45° relativamente à perpendicular.	
Pré-colheita	Manutenção da cor verde	Após maturidade fisiológica e quando as diferenças entre genótipos são evidentes: Escala 1 (90-100% de tecido verde) - 9 (0-19% de tecido verde).	
Colheita	Rendimento do Grão	Rendimento em grão/parcela (peso da casca)	

O seguinte conjunto de equações descreve a forma estatística do modelo de covariância esférica anisotrópica.

$$C(h; \theta) = \nu I(h=0) + \sigma^2 \left(1 - \frac{3}{2}h + \frac{1}{2}h^3 \right) I(h < 1)$$

em que $I(\bullet)$ é a função indicadora $h = \sqrt{\dot{x}^2 + \dot{y}^2}$
e

$$\dot{x} = [\cos(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) - \sin(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_x$$

$$\dot{y} = [\sin(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) + \cos(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_y$$

em que $s_1 = (x_1, y_1)$ são as coordenadas espaciais de um local e $s_2 = (x_2, y_2)$ são as coordenadas espaciais da segunda posição. Existem 5 parâmetros de covariância,

$$\theta = (\nu, \sigma^2, \rho, \omega_n, \omega_j)$$

em que ν é o efeito pepita, σ^2 é o patamar parcial, ρ é uma rotação em graus no sentido horário relativamente ao norte, ω_n é um parâmetro de escala para o eixo menor e ω_j é um parâmetro de escala para o eixo principal de uma elipse anisotrópica de igual covariância. Os cinco parâmetros de covariância que definem a tendência espacial serão então estimados utilizando dados de parcelas de polinizadores fortemente replicados através de uma abordagem de máxima verosimilhança restrita. Num ensaio de campo com múltiplas

localizações, as tendências espaciais são modeladas separadamente para cada local.

Depois de obter os parâmetros de variância do modelo, uma estrutura de variância de covariância é gerada para o conjunto de dados a serem analisados. Esta estrutura de variância-covariância contém informações espaciais necessárias para ajustar os dados de rendimento de dependência espacial. Neste caso, um modelo hierárquico que melhor representa o tratamento e desenho experimental do estudo é utilizado juntamente com a estrutura de variância-covariância para ajustar os dados de rendimento. Durante este processo, os efeitos do viveiro ou dos lotes de sementes também podem ser modelados e estimados para ajustar os rendimentos para qualquer paridade de rendimento causada por diferenças de lotes de semente.

Depois são gerados dados espacialmente ajustados de diferentes locais, todos os dados ajustados são combinados e analisados assumindo posições como repetições. Nesta análise, variâncias intra e inter-localização são combinados para estimar o erro padrão do rendimento de plantas transgênicas e plantas de controlo. Comparações médias relativos são usadas para indicar melhorias de rendimento estatisticamente significativas.

Os exemplos seguintes ilustram aspectos da invenção.

Exemplo 1

Este exemplo ilustra a construção de plasmídeos para a transferência de ADN recombinante para células vegetais que podem ser regeneradas em plantas transgênicas da presente invenção. Os iniciadores para a amplificação por PCR de nucleótidos de ADN recombinante que codificam para proteínas foram concebidos nos ou perto dos codões de iniciação e de paragem da sequência de codificação, de modo a eliminar a maior parte das regiões 5' e 3' não traduzidas. Cada ADN recombinante que codifica para uma proteína identificada na Tabela 1, foi amplificado por PCR antes da inserção no local de inserção de um dos vectores de base, como referenciado na Tabela 1.

Um vector base de transformação de planta pMON65154 foi fabricado para uso na preparação de ADN recombinante para a transformação em tecidos de milho utilizando sistemas de vectores de expressão de plantas GATEWAY™ Destination (disponível da Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Com referência aos elementos descritos na Tabela 3 abaixo e SEQ ID NO: 9, pMON65154 compreende uma cassette de expressão do marcador de selecção e uma cassette de expressão do ADN recombinante molde. A cassette de expressão do marcador compreende um promotor CaMV 35S ligado operativamente a um gene que codifica para a neomicina fosfotransferase II (*nptII*) seguido por uma região 3' de um gene da nopalina sintase (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*. A cassette de expressão do ADN recombinante molde está posicionada cauda a cauda com a

cassete de expressão do marcador. A cassete de expressão do ADN recombinante molde compreende ADN de regulação 5' incluindo um promotor da actina 1 do arroz, exão e intrão, seguido por um local de inserção GATEWAY™ para ADN recombinante, seguido de uma região 3' de um gene do inibidor da proteinase da batata II (*pinII*). Uma vez inserido o ADN recombinante no local de inserção, o plasmídeo é útil para a transformação de plantas, por exemplo, por bombardeamento de microprojecteis.

Tabela 3

FUNÇÃO	ELEMENTO	REFERÊNCIA
Cassete de expressão de gene de planta de interesse	Promotor da actina 1 do arroz	Patente U.S 5,641,876
	Exão 1 da actina 1 do arroz, potenciador do intrão 1	Patente U.S 5,641,876
Local de inserção do gene de interesse	<i>AttR1</i>	Manual de Instruções da Tecnologia de Clonagem GATEWAY™
	Gene CmR	Manual de Instruções da Tecnologia de Clonagem GATEWAY™
	Genes <i>ccdB</i> , <i>ccdB</i>	Manual de Instruções da Tecnologia de Clonagem GATEWAY™
	<i>attR2</i>	Manual de Instruções da Tecnologia de Clonagem GATEWAY™
Cassete de expressão de gene de planta de interesse	Região 3' <i>pinII</i> de batata	An et al. (1989) Plant Cell 1:115-122
Cassete de expressão do marcador de selecção de planta	Promotor CaMV 35S	Patente U.S. 5,858,742
	Marcador de selecção <i>nptII</i>	Patente U.S. 5,858,742
	Região 3' <i>nos</i>	Patente U.S. 5,858,742
Manutenção em <i>E. coli</i>	Origem de replicação <i>ColE1</i>	
	Origem de replicação <i>F1</i>	
	Origem de replicação <i>Bla</i>	

um plasmídeo de vector base semelhante pMON72472 (SEQ ID NO: 10) foi construído para uso em métodos de transformação de planta mediados por *Agrobacterium* similar a pMON65154 excepto (a) o ADN de regulação 5' na cassette de expressão de ADN recombinante molde foi um promotor de actina de arroz e um intrão da actina de arroz, (b) adicionaram-se à esquerda e à direita sequências flanqueadoras T-ADN de *Agrobacterium* com a sequência à direita localizada a 5' do promotor da actina 1 do arroz e a sequência à esquerdo localizada a 3' do promotor 35S e (c) adiciona-se ADN de modo a facilitar a replicação do plasmídeo tanto em *E. coli* como em *Agrobacterium tumefaciens*. O DNA adicionado ao plasmídeo fora das sequências T-ADN inclui uma origem de replicação de ADN com um elevada gama de hospedeiros *oriV*, funcional em *Agrobacterium*, uma origem de replicação pBR322 funcional em *E. coli*, e um gene de resistência à espectinomicina/estreptomicina para selecção tanto de *E. coli* como de *Agrobacterium*. Constrói-se pMON74775 num vector base, essencialmente, o mesmo que pMON72472.

Exemplo 2

Este exemplo ilustra a transformação de plantas útil na produção de plantas de milho transgénicas desta invenção. As plantas de milho de uma linha facilmente transformável são cultivadas na estufa e as espigas colhidas quando os embriões têm um comprimento de 1,5 a 2,0

mm. A superfície das espigas é esterilizada por pulverização ou por imersão em etanol a 80%, seguida por secagem ao ar. Os embriões imaturos são isolados de grãos individuais em espigas com a superfície esterilizada. Antes da inoculação de células de milho, as células de *Agrobacterium* são cultivadas durante a noite à temperatura ambiente. Embriões imaturos de milho são inoculados com *Agrobacterium* logo após excisão, e incubados à temperatura ambiente com *Agrobacterium* durante 5-20 minutos. Os embriões imaturos são depois co-cultivadas com *Agrobacterium* durante 1 a 3 dias a 23°C no escuro. Embriões em co-cultura são transferidos para meios de selecção e cultivados durante aproximadamente duas semanas para permitir o desenvolvimento do calo embriogénico. O calo embriogénico é transferido para meio de cultura contendo 100 mg/L de paromomicina e subcultivado a cerca de duas semanas de intervalo. Os transformantes são recuperados 6 a 8 semanas após o início da selecção.

Vectores plasmídicos são preparados clonando ADN identificado na Tabela 1 na base identificada para uso na transformação de milho para a produção de plantas e semente transgénicas de milho.

Para a transformação mediada por *Agrobacterium* de calo do milho, embriões imaturos são cultivados durante cerca de 8-21 dias após a excisão para permitir o desenvolvimento do calo. O calo é então incubado durante

cerca de 30 minutos à temperatura ambiente com a suspensão de *Agrobacterium*, seguida da remoção do líquido por aspiração. O calo e *Agrobacterium* são co-cultivados sem selecção durante 3-6 dias, seguindo-se a selecção em paromomicina durante aproximadamente 6 semanas, com transferências bissemanais para meios frescos, e os calos resistentes à paromomicina são identificados como contendo o ADN recombinante numa cassete de expressão.

Para a transformação por bombardeamento de microprojecteis, embriões imaturos de milho são isolados e cultivados 3-4 dias antes do bombardeamento. Antes do bombardeamento de microprojecteis, uma suspensão de partículas de ouro é preparada sobre a qual as cassetes de expressão de ADN recombinante desejadas são precipitadas. O ADN é introduzido em células de milho como descrito nas Patentes U.S. 5,550,318 e 6,399,861 através de um dispositivo de administração de genes através da aceleração de partículas por descarga eléctrica. Após o bombardeamento de microprojecteis, o tecido é cultivado no escuro, a 27°C.

Para regenerar plantas transgénicas de milho, calos transgénicos resultantes da transformação são colocados no meio para iniciar o desenvolvimento de rebentos em plântulas que são transferidos para solo de envasamento para o crescimento inicial em câmara de crescimento a 26 °C, seguido por um banco de névoa antes de transplantar para potes de 21,7 cm (5 polegadas) onde as

plantas são cultivadas até a maturidade. As plantas são auto-fertilizadas e a semente é recolhida para triagem como sementes, juvenis ou híbridos ou plantas R2 de descendência, por exemplo, para ensaios de rendimento nos rastreios acima indicados.

Exemplo 3

Este exemplo ilustra ainda mais a produção e identificação de sementes transgénicas para milho transgénico com um rendimento melhorado em comparação com plantas de controlo. Sementes e plantas de milho transgénico que compreendem o ADN recombinante a partir de cada um dos genes clonados num dos vectores de base tais como identificados na Tabela 1 são preparados por transformação. Muitos eventos transgénicos que sobrevivem a plantas transgénicas férteis que produzem sementes e plantas de descendência não irão apresentar uma característica agronómica melhorada. As plantas e sementes transgénicas com características agronómicas melhoradas desta invenção são identificadas por rastreio para a eficiência de utilização de azoto, rendimento, eficiência do uso da água e tolerância ao frio. As plantas transgénicas que fornecem sementes com composições melhoradas de sementes são identificados através da análise de composições de sementes, incluindo a proteína, óleos e os níveis de amido.

Rendimento

As plantas transgênicas com maior rendimento proporcionadas por esta invenção foram seleccionadas através do processo de selecção de acordo com o procedimento padrão descrito acima e o desempenho destas plantas transgênicas é mostrado nas Tabelas 4 e 5 abaixo, indicando a mudança no rendimento do milho medido em "bushels" por acre.

Tabela 4

	Rendimento em Latifúndio		Rendimento em elevada densidade
Evento	Ano 1	Ano 2	
24861	3,9	-2,22	-5,3
24862	0,51	-1,86	2,8
24870	2,33	5,41	7,81
24874	5,21	2,61	8,21
26391	1,13	-3,59	5,1

Tabela 5

Evento	Delta	Percentagem de alteração	Valor P
ZM M81660	-6,20	-3,47	0,05
ZM M81671	-21,99	-12,32	0,00
ZM M81675	-23,94	-13,41	0,00
ZM M81677	-3,71	-2,08	0,23
ZM M81682	-5,58	-3,12	0,11
ZM M81684	-14,72	-8,25	0,00
ZM M81687	4,83	2,71	0,13
ZM M81688	-14,64	-8,20	0,00

Exemplo 4

Este exemplo ilustra plantas transgênicas com características melhoradas através de combinações. Como ilustrado no Exemplo 3, as plantas transgênicas com características agronômicas melhoradas são geradas utilizando o ADN recombinante de cada um dos genes identificados na Tabela 1. Para produzir uma aumento ainda maior das características agronômicas das plantas transgênicas, os genes da Tabela 1 são combinados com um ou mais genes adicionais que melhoram características agronômicas para gerar uma planta transgênica com um aumento mais pronunciado numa ou mais características agronômicas do que cada gene isoladamente. Esta combinação é obtida através quer por transformação ou por reprodução. O exemplo a seguir ilustra esse princípio.

Uma planta de milho transgênico estavelmente transformada com uma construção, pMON74923, contendo a o gene fitocromo B (phyB) de *Zea mays* (SEQ ID NO: 15), sob o controlo do promotor de uma aldolase de milho (FDA) (pedido de patente U.S No. Série 09/757,089) foi cruzada com uma planta de milho transgênico estavelmente transformada com pMON68392. O cruzamento demonstrou um aumento do rendimento (bu./a) de 7,2% em comparação com a planta de milho contendo o gene phyB sozinho (2,4%).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Monsanto Technology LLC
 Lund, Adrian
 Deikman, Jill
 Anstrom, Donald
 Chomet, Paul
 Heard, Jacqueline

<120> PLANTAS TRANSGÊNICAS COM CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS MELHORADAS

<130> 38-21(53720)C

<150> 60/638,099

<151> 2004-12-21

<150> 60/660,320

<151> 2005-03-10

<160> 15

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 828

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<401> 1

atgataaaac tactatttac gtacatatgc acatacacat ataaactata tgctctatat	60
catatggatt aogcatgogt gtgtatgtat aaatataaag gcacogtcac gottcaagtt	120
tgtctctttt atattaaact gagagttttc ctctcaaact ttaccttttc ttcttcgatc	180
ctagctctta agaaccctaa taattcattg atcaaaataa tggcgatttt gcgggaaaac	240
tcttcaaact tggatcttac tatctcogtt ccaggcttct ctccatcccc tctctccgat	300
gaaggaagtg gcggaggaag agaccagcta aggctagaca tgaatcgggt accgtcgtct	360
gaagacggag acgatgaaga attcagtcac gatgatggct ctgctcctcc gcgaaagaaa	420
ctccgtctaa ccagagaaca gtcaogtctt cttgaagata gtttcagaca gaatcatacc	480
cttaatccca aacaaaagga agtacttgcc aagcatttga tgctaaggcc aagacaaatt	540
gaagtttggt ttcaaaaccg tagagcaagg agcaaattga agcaaaccga gatggaatgc	600
gagtatctca aaaggtggtt tggttcatta acggaagaaa accacaggct ccatagagaa	660
gtagaagagc ttagagccat aaagggtlggc ccaacaacgg tgaactctgc ctcgagcctt	720
actatgtgtc ctogctgoga gcgagttacc cctgccgoga gcccttcgag ggcgggtggtg	780
ccgggtccgg ctaagaaaac gtttccgccc caagagcgtg atcgttga	828

<210> 2
 <211> 678
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 2
 atgggggtcca cttctccttc aggcctggag ctcaaccatgg ctgtcccggg cctcagctcc 60
 tcctctgggt cagaggggtt tggatgcaac aacaacaacg ggagcgggaa cgggaacaac 120
 atgagggacc tggacatgaa ccagccggcg agcggcggcg aggaggagga gttcccaatg 180
 gggagcgtgg aggaggagga ggacgagcgc ggcggcggcg gcgggcccga ccgcgccaaag 240
 aagctccggc tgtccaagga gcagtcccgc ctcttgagg agagcttccg cctcaaccac 300
 accctcacac cgaagcaaaa ggaggccttg gctgtcaagc tcaagctgag gccacggcag 360
 gtggaggtct ggttccagaa ccgcagggtt aggaacgaagc ttaagcagac ggagctggag 420
 tgcgagtacc tgaagcgtg cttcggctcg ctgaaccagg agaaccggcg gctgcagcgg 480
 gaggtggagg agctgcgcgc gatgcgggtg gccccgccca ccgtgctctc ccgcacacc 540
 cggcagccgc tcccggcgtc cgcgctcacc atgtgccgcg gctgcgagcg caccaccgcc 600
 gcaacggccg cgcgcacccc acgcccgcgc ccgcgcgcga gccccttcca ccgcgcgcgc 660
 ccgtccgcgc cgttttag 678

<210> 3
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<400> 3
 atggcgggtt taccaagtag ctctcaagc ttggaattga ccatatctgt acctggtttt 60
 gcttcttcac caacccttct tccctcatca tctgtgaaag aattggacat aatcaagta 120
 cctcttgaag aagattggat ggcacaaaac atggaagatg aagaagaaag cagcaatgga 180
 gaacctcttc gaaagaaact ccgtctcaca aaggaacaat ctcttctctt tgaagaaagc 240
 tttagacaaa accacacgtt gaacccaaag cagaaagagt ctttggcaat gcaactgaag 300
 ctgcgaccaa ggcaagtgga ggtgtggttt cagaaccgta gggccaggag caagctgaag 360
 cagacagaga tggagtgcca gtacctcaag aggtggttcg gttccctcac agagcagaac 420
 cggaggctcc agagggaagt ggaggagctg cgagccatta aggtgggccc acccacctg 480
 atctccctc actcctgcca accgctcccg gcctccacac tttccatgtg tcccgcgtgc 540
 gagcgtgtca cctccaccgc cgacaaaccg cctccgcgcg cggccacttt gtccgctaaa 600
 gtgcgcgcaa ctcaatcccg ccaaccctcc ggggcctgtt ag 642

<210> 4

<211> 690
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 4
 atgatggggg ccacttctcc gtcaggcctg gagctcacca tggctgtccc cggcctcagc 60
 tectctgggt cagaaggggc cggttgcaac aacaacaacg ccggtggcgg ctgcaacatg 120
 agggacctgg acatcaacca gccggcgagc ggcgcgagg aggaggagt cccgatgggc 180
 agcgtggagg aggacgagga ggagaggggc gtcggtgggc cccaccgcc caagaagctc 240
 cgcctctcca aggagcagtc ccgcctctc gaggagagct tccgcctcaa ccataccctc 300
 acgcogaagc aaaaggaggc cttggcgatc aaactgaagc tgcggccgag gcaggtggag 360
 gtctgggttc agaaccgtag ggcaaggacg aagctgaagc agaaggagat ggagtgcgag 420
 tacctgaagc gctgcttcgg gtcgctgacg gaggagaacc gccggtgca gcgggaggtg 480
 gaggagctgc gggcgatgcg ggtggcccg cccacggtgc tctgcgcga caccaggcag 540
 ccgctcccg cgctccgct caccatgtgc ccccgctgc agcgcatcac cgcggccacc 600
 ggcgcgcctg ccgtgcgcc gccgcgctg tcagccgcg ccgcgcgcc ctcgccttc 660
 caccctgcc gccctctgc ggcttctag 690

<210> 5
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 5
 Met Ile Lys Leu Leu Phe Thr Tyr Ile Cys Thr Tyr Thr Tyr Lys Leu
 1 5 10 15
 Tyr Ala Leu Tyr His Met Asp Tyr Ala Cys Val Cys Met Tyr Lys Tyr
 20 25 30
 Lys Gly Ile Val Thr Leu Gln Val Cys Leu Phe Tyr Ile Lys Leu Arg
 35 40 45
 Val Phe Leu Ser Asn Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ile Leu Ala Leu Lys
 50 55 60
 Asn Pro Asn Asn Ser Leu Ile Lys Ile Met Ala Ile Leu Pro Glu Asn
 65 70 75 80
 Ser Ser Asn Leu Asp Leu Thr Ile Ser Val Pro Gly Phe Ser Ser Ser
 85 90 95
 Pro Leu Ser Asp Glu Gly Ser Gly Gly Gly Arg Asp Gln Leu Arg Leu
 100 105 110

Asp Met Asn Arg Leu Pro Ser Ser Glu Asp Gly Asp Asp Glu Glu Phe
 115 120 125

Ser His Asp Asp Gly Ser Ala Pro Pro Arg Lys Lys Leu Arg Leu Thr
 130 135 140

Arg Glu Gln Ser Arg Leu Leu Glu Asp Ser Phe Arg Gln Asn His Thr
 145 150 155 160

Leu Asn Pro Lys Gln Lys Glu Val Leu Ala Lys His Leu Met Leu Arg
 165 170 175

Pro Arg Gln Ile Glu Val Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Arg Ser Lys
 180 185 190

Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr Leu Lys Arg Trp Phe Gly
 195 200 205

Ser Leu Thr Glu Glu Asn His Arg Leu His Arg Glu Val Glu Glu Leu
 210 215 220

Arg Ala Ile Lys Val Gly Pro Thr Thr Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Met Cys Pro Arg Cys Glu Arg Val Thr Pro Ala Ala Ser Pro Ser
 245 250 255

Arg Ala Val Val Pro Val Pro Ala Lys Lys Thr Phe Pro Pro Gln Glu
 260 265 270

Arg Asp Arg
 275

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 6
 Met Gly Ser Thr Ser Pro Ser Gly Leu Glu Leu Thr Met Ala Val Pro
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ser Ser Ser Gly Ser Glu Gly Phe Gly Cys Asn Asn Asn
 20 25 30

Asn Gly Ser Gly Asn Gly Asn Asn Met Arg Asp Leu Asp Met Asn Gln

35	40	45
Pro Ala Ser Gly Gly Glu Glu Glu Glu Phe Pro Met Gly Ser Val Glu		
50	55	60
Glu Glu Glu Asp Glu Arg Gly Gly Ala Gly Gly Pro His Arg Ala Lys		
65	70	75 80
Lys Leu Arg Leu Ser Lys Glu Gln Ser Arg Leu Leu Glu Glu Ser Phe		
	85 90	95
Arg Leu Asn His Thr Leu Thr Pro Lys Gln Lys Glu Ala Leu Ala Val		
	100 105	110
Lys Leu Lys Leu Arg Pro Arg Gln Val Glu Val Trp Phe Gln Asn Arg		
	115 120	125
Arg Ala Arg Thr Lys Leu Lys Gln Thr Glu Leu Glu Cys Glu Tyr Leu		
	130 135	140
Lys Arg Cys Phe Gly Ser Leu Thr Glu Glu Asn Arg Arg Leu Gln Arg		
145	150 155	160
Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Met Arg Val Ala Pro Pro Thr Val Leu		
	165 170	175
Ser Pro His Thr Arg Gln Pro Leu Pro Ala Ser Ala Leu Thr Met Cys		
	180 185	190
Pro Arg Cys Glu Arg Ile Thr Ala Ala Thr Ala Ala Arg Thr Pro Arg		
	195 200	205
Pro Pro Pro Ala Ala Ser Pro Phe His Pro Arg Arg Pro Ser Ala Ala		
210	215 220	
Phe		
225		

<210> 7

<211> 213

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 7

Met Ala Val Leu Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ile Ser
1 5 10 15

Val Pro Gly Phe Ala Ser Ser Pro Thr Leu Leu Pro Ser Ser Ser Val
20 25 30

Lys Glu Leu Asp Ile Asn Gln Val Pro Leu Glu Glu Asp Trp Met Ala
35 40 45

Ser Asn Met Glu Asp Glu Glu Glu Ser Ser Asn Gly Glu Pro Pro Arg
50 55 60

Lys Lys Leu Arg Leu Thr Lys Glu Gln Ser Leu Leu Leu Glu Glu Ser
65 70 75 80

Phe Arg Gln Asn His Thr Leu Asn Pro Lys Gln Lys Glu Ser Leu Ala
85 90 95

Met Gln Leu Lys Leu Arg Pro Arg Gln Val Glu Val Trp Phe Gln Asn
100 105 110

Arg Arg Ala Arg Ser Lys Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr
115 120 125

Leu Lys Arg Trp Phe Gly Ser Leu Thr Glu Gln Asn Arg Arg Leu Gln
130 135 140

Arg Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Val Gly Pro Pro Thr Val
145 150 155 160

Ile Ser Pro His Ser Cys Glu Pro Leu Pro Ala Ser Thr Leu Ser Met
165 170 175

Cys Pro Arg Cys Glu Arg Val Thr Ser Thr Ala Asp Lys Pro Pro Ser
180 185 190

Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Lys Val Pro Pro Thr Gln Ser Arg Gln
195 200 205

Pro Ser Ala Ala Cys
210

<210> 8

<211> 229

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 8

Met Met Gly Ala Thr Ser Pro Ser Gly Leu Glu Leu Thr Met Ala Val

1		5				10				15					
Pro	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Cys	Asn	Asn	Asn
		20						25					30		
Asn	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Asn	Met	Arg	Asp	Leu	Asp	Ile	Asn	Gln	Pro
		35					40					45			
Ala	Ser	Gly	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Phe	Pro	Met	Gly	Ser	Val	Glu	Glu
	50					55					60				
Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Gly	Gly	Pro	His	Arg	Pro	Lys	Lys	Leu
65					70					75					80
Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Gln	Ser	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Phe	Arg	Leu
			85						90					95	
Asn	His	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Gln	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Lys	Leu
			100					105					110		
Lys	Leu	Arg	Pro	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Ala
		115					120					125			
Arg	Thr	Lys	Leu	Lys	Gln	Thr	Glu	Met	Glu	Cys	Glu	Tyr	Leu	Lys	Arg
	130					135					140				
Cys	Phe	Gly	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	Asn	Arg	Arg	Leu	Gln	Arg	Glu	Val
145					150					155					160
Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Met	Arg	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Leu	Ser	Pro
				165					170					175	
His	Thr	Arg	Gln	Pro	Leu	Pro	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Met	Cys	Pro	Arg
			180					185					190		
Cys	Glu	Arg	Ile	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Pro	Pro	Ala	Val	Arg	Pro	Pro
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Pro	Phe	His	Pro	Arg	Arg
	210					215					220				
Pro	Ser	Ala	Ala	Phe											
225															

<210> 9

<211> 9215

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> vector

<400> 9

```

actcaccagt cacagaaaag catcttaagg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg      60
ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact totgacaacg atcggaggac      120
cgaaggagct aacgcgtttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggt      180
gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag      240
caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaaact acttaactcta gcttcccgcc      300
aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc      360
ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta      420
tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgat ogtagttatc tacacgacgg      480
ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga      540
ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actaatatat acttttagatt gatttaaaac      600
ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaacaaaa      660
tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat      720
cttcttgaga tccctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc      780
taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg      840
gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccctctagt gtagccgtag ttaggccacc      900
acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg      960
ctgotgccag tggcgataag tegtgtotta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg     1020
ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gtctgtgcac acagcccagc ttggagcgaa     1080
cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg     1140
aagggagaaa ggcgacagc tatccggtaa gcggcagggt cggaaacagga gagcgcacga     1200
gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcggggtt cgcacctct     1260
gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggog gagcctatgg aaaaacgcca     1320
gcaacgcggc ctttttacgg ttccctggcc tttgctggcc ttttgotcac atgttctttc     1380
ctgcgttato cctgattct gtggataaac gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg     1440
ctcgcgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc     1500
caatacgcaa accgcctctc ccgcgcggtt ggcgattca ttaatgcagc tggcacgaca     1560
ggtttccgga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc     1620

```

attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttggtg ggaattgtga 1680
 gccgataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaaag ctcgaaatta 1740
 accctcacta aagggaacaa aagctggagc tgagtactgg ccgcgcctgc gccgcctoga 1800
 ggtcaltcat atgcttgaga agagagtcgg gatagtccaa aataaaacaa aggttaagatt 1860
 acctggtcaa aagtgaacac atcagttaaa aggtgggtata aagtaaaata tcggtaataa 1920
 aaggtggccc aaagtgaat ttactctttt ctactattat aaaaattgag gatgtttttg 1980
 togttacttt gatacgtcat ttttgtatga attgggtttt aagtttatc gcttttggaa 2040
 atgcatactt gtatttgagt cgggttttaa gttcgtttgc ttttgtaaat acagagggat 2100
 ttgtataaga aatatcttta aaaaaaccca tatgctaatt tgacataatt tttgagaaaa 2160
 atatatattc aggcgaattc tcacaatgaa caataataag attaaaatag ctttcctccg 2220
 ttgcagcgca tgggtatttt ttctagtaaa aataaaagat aaacttagac tcaaaacatt 2280
 taaaaaaca acccctaaag ttctaaagc ccaaagtgc atccacgac cattagcaag 2340
 gccagccca acccaaccca acccaaccca cccagtcga gccaaactga caatagtctc 2400
 ccccccggc actatcaccg tgagttgtcc gcaccacgc acgtctcgca gccaaaaaaa 2460
 aaaaaagaaa gaaaaaaaag aaaaagaaaa acagcaggtg ggtccgggtc gtggggggcg 2520
 gaaaagcgag gaggatcgcg agcagcgacg agggccggcc ctccctccgc ttccaaagaa 2580
 acgccccca tggccactat atacataccc cccctctcc tcccatccc ccaacctac 2640
 caccaccacc accaccacct cctccccct cgtgcggga cgaagagctc ctccccctc 2700
 cccctccgc gccgcggta accaccgc cctctctc tttcttctc cgttttttt 2760
 ttctctcgg tctcgatctt tggccttgg agtttgggtg ggcgagagcg gcttcgtcgc 2820
 ccagatcgg ggcggggagg ggcggtatct cgcggctggc gtctccgggc gtgagtcggc 2880
 cgggatcctc gccgggaatg gggctctcgg atgtagatct gatccgcgt tgttggggga 2940
 gatgatggg ggtttaaat ttccgccatg ctaaacaaga tcaggaagag gggaaaagg 3000
 cactatgggt tatattttta tatatttctg ctgcttcgtc aggttagat gtgctagatc 3060
 tttctttct ctttttgtgg gtagaatttg aatccctcag cattgttcat cggtagtttt 3120
 tcttttcagt atttgtgaca aatgcagcct cgtgcggagc tttttgtag gtagaccgcg 3180
 ggatacaca agtttgtaca aaaaagctga acgagaaacg taaaatgata taaatatcaa 3240
 tataataaat tagattttgc ataaaaaaca gactacataa tactgtaaaa cacaacatat 3300
 ccagtcacta tggcgccgc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg 3360
 tataatgtgt ggattttgag ttaggatccg togagatttt caggagctaa ggaagctaaa 3420
 atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 3480

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	3540
attacgggctt ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggccotttatt	3600
cacattcttg ccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg	3660
gagctgggtga tatgggatag tgttcacct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa	3720
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gaagatttcc ggcagtttct acacatatat	3780
tcgcaagatg tggcgtgcta cgggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	3840
aatatgtttt tctctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg	3900
gccaatatgg acaacttctt cgcctccgtt ttcaccatgg gcaaatatta tacccaaggg	3960
gacaagggtgc tgatgcgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggcttccat	4020
gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgtaa	4080
acgcgtggat ccggcttact aaaagccaga taacagtatg cgtatttgcg cgtgatttt	4140
tgcggtataa gaatatatac tgatatgtat acccgaagta tgtcaaaaag aggtgtgcta	4200
tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca gcgacagcta tcagttgctc aaggcatata	4260
tgatgtcaat atctccggtc tggtaagcac aaccatgcag aatgaagccc gtctctgcg	4320
tgcgaacgc tggaaagcgg aaaatcagga agggatggct gaggtcgccc ggtttattga	4380
aatgaacggc tcttttctg acgagaacag gggctgggtg aatgcagttt aaggtttaca	4440
cctataaaaag agagagccgt tatcgtctgt ttgtggatgt acagagtgat attattgaca	4500
cgcctggggcg accgatggtg atccccctgg ccagtgcacg tctgctgtca gataaagtct	4560
ccgtgaaact ttaccgggtg gtgcatactg gggatgaaag ctggcgcatg atgaccacg	4620
atatggccag tctgcccgtc tccgttatcg gggaagaagt ggctgatctc agccaccgcg	4680
aaaatgacat caaaaacgac attaacctga tgttctgggg aatataaatg tcaggctccc	4740
ttatacacag ccagctctga ggtcgacct agtgactgga tatgttgtgt ttacagtat	4800
tatgtagtct gttttttatg caaaatctaa tttaatatat tgatatttat atcattttac	4860
gtttctcgtt cagctttctt gtacaaagtg gtgatgggga tccccaccc tgcaatgtga	4920
ccctagactt gtccatcttc ggatggccaa cttaattaat gtataaataa aaggatgcac	4980
acatagtgac atgctaata ctataatgtg ggcacaaag ttgtgtgtta tgtgtaatta	5040
ctaattatct gaataagaga aagagatcat ccatatttct tatcctaaat gaatgtcacg	5100
tgtctttata attctttgat gaaccagatg cattttatta accaattcca tatacatata	5160
aatattaatc atatataatt aatatcaatt gggtagcaa aacaaatcta gtctaggtgt	5220
gttttgctaa ttattggggg atagtgcaaa aagaaatcta cgttctcaat aattcagata	5280

gaaaaacttaa	taaagtgaga	taattttacat	agatttgcttt	tatcctttga	tatatgtgaa	5340
accatgcatg	atataaggaa	aatagataga	gaaataattt	tttacatcgt	tgaatatgta	5400
aacaatttaa	ttcaagaagc	taggaatata	aatattgagg	agtttatgat	tattattatt	5460
attttgatgt	tcaatgaagt	tttttttaat	ttcatatgaa	gtatacaaaa	attcttcata	5520
gatttttigt	tctatgmcgt	agttatcttt	aatatatttg	tggttgaaga	aattttattgc	5580
tagaaaacgaa	tggattgtca	attttttttt	aaagcaaata	tatatgaaat	tatactgtat	5640
attatttttag	tcattgattaa	aatgtggcct	taattgaatc	atctttctca	ttcattttttt	5700
caaaagcata	tcaggatgat	tgatatttat	ctatttttaa	aattaattta	agggttcaaa	5760
ttaaatttaa	cttaaaagt	tcctaaccgt	agttaaaggt	ttacttttaa	aaaatactat	5820
gaaaaatcta	atcttctatg	aatcgacctg	caggatttaa	atccatcgtt	ctggggccta	5880
acgggccaag	ctttccgatc	ctacctgtca	cttcacaaa	aggacagtag	aaaaggaagg	5940
tggcacctac	aatgccatc	attgogataa	aggaaaggct	atcattcaag	atgcctctgc	6000
cgacagtgg	cccaaagatg	gacccccacc	cacgaggagc	atcgtggaaa	aagaagacgt	6060
tcacaaccag	tcttcaaagc	aagtggattg	atgtgatact	tcactgacg	taagggatga	6120
cgcacaatcc	cactatcctt	cgcaagacc	ttcctctata	taaggaagtt	catttcattt	6180
ggagaggaca	cgctgaaatc	accagtctct	ctctacaaga	tcggggatct	ctagctagac	6240
gatcgtttcg	catgattgaa	caagatggat	tgacgcagag	ttctccggcc	gcttgggtgg	6300
agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaac	agacaatcgg	ctgctctgat	gccgcctgt	6360
tcgggtgtc	agcgcagggg	cgcccggttc	tttttgtcaa	gaccgacctg	tcgggtgccc	6420
tgaatgaact	gcaggacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	ggcggttcctt	6480
gcgcagctgt	gctcgacgtt	gtcaactgaag	cgggaaggga	ctggctgcta	ttgggcgaag	6540
tgcgggggca	ggatctcctg	tcattctacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	tcacatcatg	6600
ctgatgcaat	gcggcggctg	catacgcttg	atccggctac	ctgcccattc	gaccaccaag	6660
cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggctctgtc	gatcaggatg	6720
atctggacga	agagcatcag	gggctcgcgc	cagccgaact	gttcgccagg	ctcaaggcgc	6780
gcattgccga	cggcgaggat	ctcgtcgtga	cccattggcg	tgcttgcttg	ccgaatatca	6840
tggttgaaaa	tggccgcttt	tctggattca	tgaactgtgg	cggctgggtg	gtggcggacc	6900
gctatcagga	catagcgttg	gtaccccggt	atattgctga	agagcttggc	ggcgaatggg	6960
ctgacgcctt	cctcgtgctt	taaggatatc	ccgctcccg	ttcgcagcgc	atcgccttct	7020
atcgccttct	tgaagagttc	ttctgagcgg	gactctgggg	ttcgaagaat	tcocgatcgt	7080
tcaaacattt	ggcaataaag	tttcttaaga	ttgaatcctg	ttgccggctc	tgcgatgatt	7140

atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgia atgcatgacg	7200
ttatttatga gatggggttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta atacgcgata	7260
gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcgggtgc atctatgtta	7320
ctagatcggg gatatcgcgt gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc attttattaa	7380
ccaattccat atacatataa atattaatca tatataatta atatcaattg ggtagcaaaa	7440
acaaatctag tctaggtgtg ttttgctaatt tattggggga tagtgcaaaa agaaatctac	7500
gttctcaata attcagatag aaaacttaat aaagtgcgat aatttacata gattgctttt	7560
atcctttgat atatgtgaaa ccatgcatga tataaggaaa atagatagag aaataatttt	7620
ttacatcgtt gaatatgtaa acaatttaatt tcaagaagct aggaatataa atattgagga	7680
gtttatgatt attattatta ttttgatgtt caatgaagtt ttttttaatt tcatatgaag	7740
tatacaaaaa ttcttcctag atttttgttt ctatgccgta gttatcttta atatatttgt	7800
ggttgaagaa atttattgct agaaaacgaat ggattgtcaa ttttttttta aagcaaatat	7860
atatgaaatt atactgtata ttattttagt catgattaaa atgtggcctt aattgaatca	7920
tctttctcat tcattttttc aaaagcatat caggatgatt gatattttatc tattttaaaa	7980
attaatttaa gggttcaaat taaatttaac ttaaaagtgt cctaaccgta gttaaagggt	8040
tactttaaaa aaatactatg aaaaatctaa tcttctatga atcgaccgct gatogatcgc	8100
ggccgctggc gcgccagtac tagctagtac ccaattcgcc ctatagtgag togtattaca	8160
attcaactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta	8220
atcgcccttc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gccgcacccg	8280
atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gaaattgtaa gcgttaatat	8340
tttggttaaaa ttgcggttaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggcoga	8400
aatcgcaaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc	8460
agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaaag ggcgaaaaac	8520
cgttatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacco taatcaagtt ttttggggtc	8580
gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg	8640
gggaaagccg gcgaacgtg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag	8700
ggcgttgga agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgcgcg cgtttaatgc	8760
gccgctacag ggccgctcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg	8820
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat	8880
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat	8940

```

tccctttttt ggggcatttt gccttctgt ttttgcac ccagaaacgc tggtgaaagt 9000
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaaactgg atctcaacag 9060
cggtaagatc cttgagagtt ttgcctccga agaactgttt ccaatgatga gcacttttaa 9120
agttctgcta tgtggcgagg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 9180
cgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagt 9215

```

```

<210> 10
<211> 9747
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> vector

```

```

<400> 10

```

```

ccgacccac ctgtcacttc atcaaaagga cagtagaaaa ggaagggtggc acctacaaat 60
gccatcattg cgataaagga aaggctatca ttcaagatgc ctctgccgac agtgggtccca 120
aagatggacc cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt 180
caaagcaagt ggattgatgt gatacttcca ctgacgtaag ggatgacgca caatccact 240
atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacacgct 300
gaaatcacca gtctctctct acaagatcgg ggatctctag ctgacgacgc gtttcgcatg 360
attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc 420
tatgactggg cacaacagac aatcgggtgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg 480
cagggggcgc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag 540
gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacggggc ttccctgcgc agctgtgctc 600
gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgc ggggcaggat 660
ctcctgtcat ctacacctgc tctgcgcgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg 720
cggctgcata cgttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc 780
gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag 840
catcaggggc tcgcgcacg cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcac gcccgacggc 900
gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc 960
cgtttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata 1020
gcgttggtca cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgttctctc 1080
gtgctttaag gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcatcg cttctatcg cttctctgac 1140
gagttcttct gagcgggact ctgggggttg aagaattccc gatcgttcaa acatttggca 1200
ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgc atgattatca tataatttct 1260

```

gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg 1320
 gggtttttatg attagagtcg cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata 1380
 gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct atgttactag atcggggata 1440
 tcgcgtgtct ttataattct ttgatgaacc agatgcattt tattaaccaaa ttocatatac 1500
 atataaatat taatcatata taattaatat caattgggtt agcaaaaacaa atctagtcta 1560
 ggtgtgtttt gctaattatt gggggatagt gcaaaaagaa atctacgttc tcaataattc 1620
 agatagaaaa ctttaataaag tgagataaatt tacatagatt gcttttatcc ttgatatat 1680
 gtgaaaccat gcatgatata aggaaaatag atagagaaat aattttttac atcgttgaat 1740
 atgtaaacaa ttttaattcaa gaagctagga atataaatat tgaggagttt atgattatta 1800
 ttattatttt gatgttcaat gaagttttt ttaatttcat atgaagtata caaaaattct 1860
 tcatagattt ttgtttctat gcgtagtta tctttaatat atttgtggtt gaagaaattt 1920
 attgctagaa acgaatggat tgtcaatttt tttttaaagc aaatataat gaaattatac 1980
 tgtatattat tttagtcatg attaaaatgt ggccttaatt gaatcatctt tctcattcat 2040
 tttttcaaaa gcatatcagg atgattgata tttatctatt ttaaaaatta atttaagggt 2100
 tcaaatataa ttttaacttaa aagtgtccta accgtagtta aaggtttact ttaaaaaaat 2160
 actatgaaaa atctaattct ctatgaatcg accgctgacg gatcgcgggc gctggcgcgcg 2220
 cctcgagagg cctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag 2280
 atttccgaat tagaataaatt tgtttattgc tttcgctat aaatacgcg gatcgtaatt 2340
 tgtcgtttta tcaaaatgta ctttcatttt ataataacgc tgcggacatc tacatttttg 2400
 aattgaaaaa aaattggtaa ttactcttcc tttttctcca tattgaccat catactcatt 2460
 gctgatccat gtagatttcc cggacatgaa gccatttaca attgaatata tccctgccgc 2520
 gctgccgctt tgcacccggt ggagcttgca tgttggttcc tacgcagaac tgagccggtt 2580
 aggagataa tttccattga gaactgagcc atgtgcacct tcccccaac acggtgagcg 2640
 acggggcaac ggagtgatcc acatgggaact tttctagct tggctgccat ttttggggtg 2700
 aggcggttcg cggcgagggg gcgcagcccc tggggggatg ggaggcccg ctttagcggc 2760
 cgggaggggt cgagaagggg gggcaccccc cttcggcggtg cgcggtcacg cgcacagggc 2820
 gcagccctgg ttaaaaacaa ggtttataaa tattggttta aaagcaggtt aaaagacagg 2880
 ttagcggtgg ccgaaaaacg ggcggaaccc ctgcaaatg ctggattttc tgccctgtgga 2940
 cagccctca aatgtcaata ggtgcgcccc tcatctgtca gcactctgcc cctcaagtgt 3000
 caaggatcgc gccctcatc tgtcagtagt cgcgccccctc aagtgtcaat accgcagggc 3060

acttatcccc aggcttgtcc acatcatctg tgggaaactc gcgtaaaatc aggcgttttc	3120
gcgattttgc gaggttgccc agctccacgt cgcggccga aatcgagcct gcccctcctc	3180
tgtcaacgcc gcgcgggtg agtcggcccc tcaagtgtca acgtccgccc ctcatctgtc	3240
agtgaggggc aagttttccg cgaggatatc acaacgcgg cgccggccg cgggtgtctcg	3300
cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag	3360
cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg atcgaccgat gcccttgaga	3420
gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca tgactacggt atcagctcac	3480
tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga	3540
gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaacgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat	3600
aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac	3660
cgcacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct	3720
gttcggaccc tgcgcttac cggatacctg tcgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg	3780
ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg	3840
ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt	3900
cttgagtcca acccggttaag acacgaacta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg	3960
attagcagag cgaggatatg aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg gcctaactac	4020
ggctacaacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taacttcgga	4080
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt	4140
gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt	4200
tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgagg	4260
gaagcgggtg tcgccgaagt atcgactcaa ctatcagagg tagttggcgt catcgagcgc	4320
catctcgaac cgacgttgct ggccgtacat ttgtacggct ccgcagtggg tggcggcctg	4380
aagccacaca gtgatattga tttgctgggt acggtgaccg taaggcttga tgaaacaacg	4440
cggcgagctt tgatcaacga ccttttgaa acttcggctt cccctggaga gagcgagatt	4500
ctccgcgctg tagaagtcac cattgttggt cagcagcaca tcattccgtg gcgttatcca	4560
gctaagcgcg aactgcaatt tggagaatgg cagcgcaatg acattcttgc aggtatcttc	4620
gagccagcca cgatcgacat tgatctggct atcttgctga caaaagcaag agaacatagc	4680
gttgcccttg taggtccagc ggccgaggaa ctctttgatc cggttcctga acaggatcta	4740
tttgaggcgc taaatgaaac cttaacgcta tggaaactgc cgcgcgactg ggctggcgat	4800
gagcgaaatg tagtgcttac gttgtccgcg atttggtaca gcgcagtaac cggcaaaatc	4860
gcgccgaagg atgtcgtgc cgactgggca atggagcgcc tgccggccca gtatcagccc	4920

gtcatacttg aagctaggca ggcttatctt ggacaagaag atcgcttggc ctgcgcgcga 4980
 gatcagttgg aagaatttgt tcactacgtg aaaggcgaga tcaccaaggt agtcggcaaa 5040
 taatgtctaa caattcggtc aagccgacgc cgttcgcgg cgcggttaa ctcaagcgtt 5100
 agatgctgca ggcacgtgg tgtcacgtc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 5160
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 5220
 ctccggtcct ccgacgagg atttttcggc gctgcgctac gtcgcgcacc gcggtgaggg 5280
 atcaagccac agcagccac tcgacctct agccgaccca gacgagcaa gggatctttt 5340
 tggaatgctg ctccgtcgtc aggctttcgg acgtttgggt ggttgaacag aagtcattat 5400
 cgcacggaat gccagcact cccgagggga accctgtggt tggcatgcac atacaaatgg 5460
 acgaacggat aaaccttttc acgacctttt aaatatccga ttattctaata aaacgctctt 5520
 ttctcttagg tttaaccgac aatatactct gtcaaacact gatagtttaa acatgactct 5580
 cttaaggtag ccaaagcccc ggaattcgcc gcgcctcgcc ccgcctcgag gtcattcata 5640
 tgcttgagaa gagagtcggg atagtcacaa ataaaacaaa ggtaagatta cctggtcacaa 5700
 agtgaaaaca tcagttaaaa ggtggtataa agtaaaatat cggtaataaa aggtggccca 5760
 aagtgaattt tactcttttc tactattata aaaattgagg atgtttttgt cggtaactttg 5820
 atacgtcatt ttgtatgaa ttggttttta agttttattcg cttttggaaa tgcatactctg 5880
 tatttgagtc gggttttaag ttcgtttgot ttgttaaata cagagggatt tgtataagaa 5940
 atatctttta aaaaacccat atgctaattt gacataattt ttgagaaaaa tatatatcca 6000
 gggaattctt cacaatgaac aataataaga ttaaaatagc ttcccccggt tgcagcgcat 6060
 gggatatttt tctagtaaaa ataaaagata aacttagact caaacattt acaaaaaaca 6120
 cccctaaagt tctaaagcc caaagtgcta tcacgatcc atagcaagcc cagcccaacc 6180
 caacccaacc caaccaccc cagtccagcc aactggacaa tagtctccac accccccacc 6240
 tatcacctgt agttgtccgc acgcaccgca cgtctcgcag ccaaaaaaaaa aaaaagaaag 6300
 aaaaaaaaaa aaaagaaaaa acagcaggtg ggtccgggtc gtggggggccg gaaacgcgag 6360
 gaggatcgcg agccagcgac gaggcgggcc ctccctccgc ttccaaagaa acgcccccca 6420
 tcgccaactat atacataccc cccctctccc tcccatcccc ccaacctac caccaccaac 6480
 accaccacct caacctctc cccctcgtc gccgagcgac gagctctcc cccctcccc 6540
 tccgcgcgcg ccgcgcgggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct cgtttttttt 6600
 ttccgctctc ggtctcgatc ttgggcttg gtagtttggg tgggcgagag ggggttctgt 6660
 gcgcgccag atcgggtgoc gggagggggc ggatctcgcc gctggggctc tcgcgcgcgt 6720

ggatccggcc cggatctcgc ggggaatggg gctctcggat gtagatctgc gatccgcgt 6780
 tgttggggga gatgatgggg ggtttaaaat ttccggccatg ctaaacaaga tcaggaagag 6840
 gggaaaaggg cactatgggt tatattttta tatattctg ctgcttcgtc aggcttagat 6900
 gtgotagatc tttctttctt ctttttgtag gtagaatttg aatccctcag cattgttcat 6960
 cggtagtttt tottttcatg atttctgaca aatgcagcct cgtgcggagc tttttttag 7020
 gtagaccgcg ggatatacaca agtttctaca aaaaagctga acgagaaaac taaaatgata 7080
 taaatatcaa tatattaaat tagattttgc ataaaaaaca gactacataa tactgtaaaa 7140
 cacaacatat ccagtcacta tggcggccgc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc 7200
 ttccggctcg tataatgtgt ggattttgag ttaggatccg tcgagatttt caggagctaa 7260
 ggaagctaaa atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca 7320
 tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtaoctata accagacggt 7380
 tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc 7440
 ggctttatt cacattcttg ccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat 7500
 gaaagacggt gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga 7560
 gcaaaactgaa acgttttcat cgtctcggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct 7620
 acacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg 7680
 gtttattgag aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga 7740
 tttaaacgtg gccaatatgg acaacttctt cgcctccggt ttcaacctgg gcaaatatta 7800
 tacgcaaggc gacaagggtc tgatgcgctt ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga 7860
 tggcttccat gtccgcagaa tgcttaastga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg 7920
 cggggcgtaa acgcgtggat ccggcttact aaaagccaga taacagtatg cgtattttgcg 7980
 cgtgatttt tgcggtataa gaatatatac tgatatgtat accgaagta tgtcaaaaag 8040
 aggtatgcta tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca gcgacagcta tcagttgctc 8100
 aaggcatata tgatgtcaat atctccggtc tggtaagcac aacctgcag aatgaagccc 8160
 gtctctctgc tgccgaacgc tggaaagcgg aaaatcagga agggatggct gaggtcgccc 8220
 ggtttattga aatgaacggc tottttctg acgagaacag gggctggtga aatgcagttt 8280
 aaggtttaca cctataaaag agagagccgt tatcgtctgt ttgtggatgt acagagtgat 8340
 attattgaca cgcocggcg acggatgggt atccccctgg ccagtgacag totgctgtca 8400
 gataaagtct cccgtgaact ttaccgggtg gtgcataatc gggatgaaag ctggcgcagc 8460
 atgaccacgc atatggccag tgtgcgggtc tccgttatcg gggaagaagt ggtgatctc 8520
 agccaccgcg aaaatgacat caaaaacgcc attaacctga tgttctgggg aatataaatg 8580

```

tcaggctccc ttatacacag ccagctctgca ggtcgacccat agtgactgga tatgttgtgt 8640
tttacagtat tatgtagtct gttttttatg caaaatctaa tttaatatat tgatatatat 8700
atcattttac gtttctcggt cagctttctt gtacaaagtg gtgatgggga tccccacccc 8760
tgcaatgtga cctagactt gtccatcttc tggattggcc aacttaatta atgtatgaaa 8820
taaaaggatg cacacatagt gacatgctaa tcaactataat gtgggcatca aagttgtgtg 8880
ttatgtgtaa ttactaatta tctgaataag agaaagagat catccatatt tcttatctta 8940
aatgaatgtc acgtgtcttt ataattcttt gatgaaccag atgcatttta ttaaccaatt 9000
ccatatacat ataaatatta atcatatata attaatatca attgggttag caaaacaaat 9060
ctagtctagg tgtgttttgc taattattgg gggatagtgc aaaaagaaat ctacgttctc 9120
aataattcag atagaaaact taataaagtg agataattta catagattgc ttttatcttt 9180
tgatatatgt gaaaccatgc atgatataag gaaaatagat agagaaataa ttttttacct 9240
cgttgaatat gtaaacaatt taattcaaga agctaggaat ataaatattg aggagtttat 9300
gattattatt attattttga tgttcaatga agtttttttt aatttcatat gaagtataca 9360
aaaattcttc atagattttt gtttctatgc cgtagtcttc tttaatatat ttgtgggtga 9420
agaaatttat tgctagaaac gaatggattg tcaatttttt tttaaagcaa atatatatga 9480
aattatactg tatattattt tagtcatgat taaaatgtgg ccttaattga atcatctttc 9540
tcattcattt ttccaaaagc atatcaggat gattgatatt tatctatttt aaaaattaat 9600
ttaaggggtc aaattaaatt taacttaaaa gtgtcctaac cgtagttaaa ggtttacttt 9660
aaaaaaatcc tatgaaaaat ctaattcttt atgaatcgac ctgcaggatt taatccatc 9720
gttctggggc ctaacgggccc aagctttt 9747

```

```

<210> 11
<211> 1023
<212> PRT
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> promotor

```

```

<400> 11
Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly
1          5          10          15

Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala
20          25          30

Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly

```

35	40	45
Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Gly Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala		
50	55	60
Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys Thr Cys Thr Thr Ala Gly Cys Thr		
65	70	75
Thr Thr Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr		
	85	90
Thr Gly Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr		
	100	105
Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ala		
	115	120
Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala		
	130	135
Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Cys		
	145	150
Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr		
	165	170
Thr Ala Cys Cys Cys Thr Ala Gly Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala		
	180	185
Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr		
	195	200
Thr Gly Cys Thr Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala		
	210	215
Thr Gly Thr Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala Ala		
	225	230
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Ala Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala		
	245	250
Gly Cys Thr Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr		
	260	265
Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr		
	275	280
		285

Cys Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala
290 295 300

Ala Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr
305 310 315 320

Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
325 330 335

Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ala Gly Thr Thr Thr Ala Gly Thr Ala Thr
340 345 350

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala
355 360 365

Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Cys
370 375 380

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly
385 390 395 400

Ala Thr Cys Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys
405 410 415

Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Cys Thr
420 425 430

Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Thr Cys Thr Ala Gly Thr
435 440 445

Thr Thr Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala
450 455 460

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Thr Ala
465 470 475 480

Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala
485 490 495

Gly Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ala Cys Thr Ala
500 505 510

Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Gly
515 520 525

Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Thr Ala Gly Cys Cys Ala Cys Thr
530 535 540

Cys Gly Thr Ala Cys Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala
545 550 555 560

Ala Gly Cys Gly Cys Thr Ala Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly
565 570 575

Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly
580 585 590

Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala
595 600 605

Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Ala
610 615 620

Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly Gly Ala Gly
625 630 635 640

Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr
645 650 655

Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Thr
660 665 670

Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly
675 680 685

Gly Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys
690 695 700

Cys Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly
705 710 715 720

Thr Cys Cys Gly Gly Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Gly
725 730 735

Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Ala Thr Ala Gly Gly
740 745 750

Gly Gly Cys Gly Cys Gly Thr Gly Thr Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys
755 760 765

Gly Thr Cys Gly Cys Gly Cys Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Ala Thr
770 775 780

Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly
785 790 795 800

Cys Ala Thr Thr Cys Cys Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala
805 810 815

Thr Thr Cys Ala Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Gly Cys Cys Thr Cys
820 825 830

Thr Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala
835 840 845

Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Ala Cys Ala Cys
850 855 860

Ala Cys Cys Cys Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys
865 870 875 880

Cys Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly Ala Cys
885 890 895

Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Gly Gly Gly Gly
900 905 910

Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Gly Thr Ala Gly Thr Ala Ala Gly Cys
915 920 925

Ala Gly Cys Thr Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys
930 935 940

Thr Cys Cys Cys Cys Thr Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Ala Thr
945 950 955 960

Gly Ala Thr Cys Gly Thr Cys Gly Ala Ala Cys Cys Cys Ala Thr Cys
965 970 975

Gly Ala Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr
980 985 990

Cys Ala Cys Cys Gly Cys Gly Gly Gly Cys Gly Cys Gly Ala Thr Thr
995 1000 1005

Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Gly
1010 1015 1020

<210> 12
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> elemento

<400> 12
 accgtcttcg gtacgcgcgc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa 60
 tgctctcttg tgtgggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
 atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat atagggacat 180
 ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct 240
 tagcgggtatt tatttaagca catggttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct 300
 gttaatttag gcacaggctt catactacat gggccaatag tatagggatt catattatag 360
 gcgatactat aataatttgt togtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420
 tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaat tgtaacgoc tgaaggaata aatataaatg 480
 acgaaatttt gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcagg atcagatgca 540
 cttgttttaa atattgttgt ctgaagaaat aagtaactgac agtattttga tgcattgac 600
 tgcttggttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc ctttttggtg ctctccttac 660
 ctctgatgg tatctagtat ctaccaactg aactatatt gcttctcttt acatacgtat 720
 cttgctcgat gccttctccc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt 780
 cattgtaatg cagataccaa gggg 804

<210> 13
 <211> 9754
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> vector

<400> 13
 gatgggggac agattgtcgt ttcccgccct cagtttaaac tatcagtgtt tgacaggata 60
 tattggcggg taaacctag agaaaagagc gtttattaga ataatcggat atttaaaagg 120
 gcgtgaaaag gtttatccgt tcttcattt gtatgtgcat gccaaaccaca gggttccccc 180
 cgggagtgct tggcattccg.tgcgataatg acttctgttc aaccacccaa acgtcggaaa 240
 gcctgacgac ggagcagcat tccaaaaaga tcccttggct cgtctgggtc ggctagaagg 300
 tcgagtgggc tgetgtggct tgatccctca acgcggtcgc ggacgtagcg cagcgccgaa 360

aaatcctcga	toggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	gggggatcat	420
gtaactcgcc	ttgatcggtg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	480
gacaccaoga	tgcctgcagc	atctaacgct	tgagttaagc	cgcgcgcgga	agcggcgctcg	540
gcttgaacga	attgttagac	attatttgcc	gactaccttg	gtgatctcgc	ctttcacgta	600
gtgaacaaat	tcttccaact	gatctgcgcg	cgaggccaag	cgatcttctt	gtccaagata	660
agcctgccta	gcttcaagta	tgacgggctg	atactgggcc	ggcaggcgct	ccattgcccc	720
gtcggcagcg	acatccttcg	gcgcgatttt	gccggttact	gcgctgtacc	aaatgcggga	780
caacgtaagc	aotacatttc	gctcatcgcc	agcccagtcg	ggcggcgagt	tccatagcgt	840
taaggtttca	tttagcgcc	caaataagac	ctgttcagga	accggatcaa	agagtctctc	900
cgccgctgga	cctaccaagg	caacgctatg	ttctcttgct	tttgtcagca	agatagccag	960
atcaatgtcg	atcgtggctg	gctcgaagat	acctgcaaga	atgtcattgc	gctgccattc	1020
tccaaattgc	agttcgcgct	tagctggata	acgccacgga	atgatgtcgt	cgtgcacaac	1080
aatggtgact	tctacagcgc	ggagaatctc	gctctctcca	ggggaagccg	aagtttccaa	1140
aaggtcggtg	atcaaagctc	gccgcgttgt	ttcatcaagc	cttacgggtca	ccgtaaccag	1200
caaatacaata	tcaactgtgtg	gcttcaggcc	gccatccact	gcggagccgt	acaaatgtac	1260
ggccagcaac	gtcggttcga	gatggcgctc	gatgacgcc	actacctctg	atagttgagt	1320
cgatacttcg	gcgatcaccg	cttcctcat	gatgtttaac	tcctgaatta	agccgcgcgcg	1380
cgaagcggtg	tgggcttgaa	tgaattgtta	ggcgctatcc	tgtgctcccg	acctgcagca	1440
atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaaat	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccgccaa	1500
caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctcgc	ctcggccctt	1560
ccggctggct	ggttttattgc	tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tccgggtatc	1620
attgcagcac	tggggccaga	tggtaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	1680
agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga	cagatcgctg	agatagggtc	ctcactgatt	1740
aagcattggf	aactgtcaga	ccaagttaac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	1800
catttttaat	ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gacccaaatc	1860
ccttaacgtg	agttttcggt	ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	1920
tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaac	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	1980
ccagcggtgg	tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	ttttccgaa	ggtaactggc	2040
ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	2100
ttcaagaact	ctgtagcacc	gootacatac	ctcgtctctg	taatcctgtt	accagtggct	2160

gctgccagtg gcgataagtc gtgtottacc gggttggact caagacgata gttaccggat 2220
 aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 2280
 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccgaa 2340
 gggagaaaag cygacaggta tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggaga ggcgcaggag 2400
 gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtccctg tcgggtttcg ccacctctga 2460
 cttgagcgtc gattttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 2520
 aaogcggcct ttttaagggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct 2580
 gcgttatccc ctgattctgt ggataacogt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct 2640
 cgcgcagccc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggg agagcgcctg 2700
 atgcgggtatt ttctccttac gcctctgtgc ggtatttcac aocgcatacg gtgcactctc 2760
 agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcata cactccgcta tcgctacgtg 2820
 actgggtcat ggctgcgccc cgacaccgcg caacaccgcg tgacgcgccc tgacgggctt 2880
 gtctgctccc ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc 2940
 agaggttttc accgtcatca cggaaaacgc cgaggcagct gcggtaaagc tcatacagct 3000
 ggtcgtgaag cgattcacag atgtctgctt gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct 3060
 ccagaagcgt taatgtctgg ctcttgataa agcggggccat gtttaaggcg gttttttcct 3120
 gtttggtcac tgatgcctcc gtgtaagggg gatttctgtt catgggggta atgataccga 3180
 tgaaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttaactgatga tgaacatgcc cggttactgg 3240
 aacgttgtga gggtaaacia ctggcgggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc 3300
 aggggtcaatg ccagcgcttc gtttaatacag atgtagggtg tccacagggt agccagcagc 3360
 atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcaggcgcg tgacttccgc gtttccagac 3420
 tttacgaaac acggaaaacg aagaccattc atgttgttgc tcagggtgca gacgttttgc 3480
 agcagcagtc gtttcacgtt cgtctcgcta tcggtgatto attctgctaa ccagtaaggc 3540
 aaccccgcca gcctagccgg gtctcaacg acaggagcac gatcatgcgc acccgtggcc 3600
 aggacccaac gctgcccag atgcgcgcg tgccgctgct ggagatggcg gacgcgatgg 3660
 atatgttctg ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc 3720
 caattcttgg agtgggtgaat ccgttagcga ggtgccgcg gcttccattc aggtcgaggt 3780
 ggcccggtc catgcacgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggata gggcggcgccc 3840
 tacaatccat gccaaacogt tccatgtgct cgcgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat 3900
 cagcgggtcca atgatcgaag ttaggtggt aagagccgcg agcgatcctt gaagctgtcc 3960
 ctgatggctg tcattacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc 4020

gccggaagcg agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgctg cgaacgccag 4080
 caagacgtag cccagecgct cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgccgaa 4140
 acgtttggtg gggggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac 4200
 cgcaagcgac agggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac 4260
 ccagagcgct gccggcacct gtctacgag ttgcattgata aagaagacag tcataagtgc 4320
 ggcgacgata gtcatgcccc gggccaccg gaaggagctg actgggttga aggtctctca 4380
 gggcatcggt cgatcgaccc ttccgacgc tcaccgggct ggttgccctc gccgctgggc 4440
 tggcgccgct ctatggccct gcaaacgcgc cagaaacgcc gtggaagccg tgtgagagac 4500
 accgcgcccg gccgcggcg ttgtggatac ctcgcgga aaattggccct cactgacaga 4560
 tgagggggcg acgttgacac ttgaggggccc gaactaccgc gcgcggcggt gacagatgag 4620
 gggcaggctc gatttcggcc ggagacgtg agctggccag cctcgcaaat cggcgaaaac 4680
 gcctgatttt acgagagttt cccacagatg atgtggacaa gcctggggat aagtgcctg 4740
 cggatttgac acttgagggg cgcgaactac gacagatgag gggcgcgatc cttgacactt 4800
 gaggggcaga gtgtgacag atgaggggccc cactatttga catttgaggg gctgtccaca 4860
 ggcagaaaat ccagcatttg caagggttcc cggccgtttt tggccaccg ctaacctgtc 4920
 ttttaacctg cttttaaac aatatttata aacottgttt ttaaccaggg ctgcgcctg 4980
 tgcgcgtgac cgcgcacgcc gaaggggggt gccccccctt ctggaacct ccgggccccg 5040
 taaogcgggc ctccatccc cccaggggct gggccctcg gccgcgaacg gcctcacccc 5100
 aaaaatggca gccaaagctag gaaaagtccc atgtggatca ctccgttgcc cgtcgctca 5160
 ccgtgttggg gggaagggtc acatggctca gttctcaatg gaaattatct gcctaaccgg 5220
 ctacgttctg cgtagaaacc aacatgcaag ctccaccggg tgcaaacggg cagcgcgggc 5280
 aggatatatt caattgtaaa tggcttcatg tcggggaaat ctacatggat cagcaatgag 5340
 tatgatggtc aatatggaga aaaagaaaga gtaattacca atttttttc aattcaaaaa 5400
 tgtagatgtc cgcagcgta ttataaaatg aaagtacatt ttgataaaac gacaaattac 5460
 gatccgtcgt atttataggc gaaagcaata aacaaattat tctaattcgg aaatctttat 5520
 ttcgacgtgt ctacattcac gtccaaatgg gggcttagat gagaaacttc acgatcgatg 5580
 cggccaccac tcgagaagct tactagtcaa caattggcca atctttgttc taaattgcta 5640
 ataaaagacc atttcgctca attctccttg gttgcaacag tctaccgctc aaatgtttac 5700
 taatttataa gtgtgaagtt tgaattatga aagacgaaat cgtattaaaa attcacaaga 5760
 ataaacaact ccatagattt tcaaaaaaac agtcacgaga aaaaaaccac agtcocgtttg 5820

tctgctcttc	tagtttttat	tattttttota	ttaatagttt	tttgttattt	cgagaataaaa	5880
atttgaacga	tgtoogaacc	acaaaagccg	agccgataaa	tcctaagccg	agcctaactt	5940
tagccgtaac	catcagtcac	ggctcccggg	ctaattcatt	tgaaccgaat	cataatcaac	6000
ggtttagatc	aaactcaaaa	caatctaacg	gcaacataga	cgcgtcgggtg	agctaaaaag	6060
agtgtgaaag	ccagggtcacc	atagcattgt	ctctcccaga	ttttttattt	gggaaataat	6120
agaagaaata	gaaaaaaata	aaagagtgag	aaaaatcgta	gagctatata	ttcgcacatg	6180
tactcgtttc	gcttttcctta	gtgttagctg	ctgcgcgtgt	tgtttctcct	ccattttctct	6240
atctttctct	ctcgctgctt	ctogaatctt	ctgtatcctc	ttcttcttct	tcaagggtgag	6300
tctctagatc	cgttcgcttg	attttgctgc	tcgttagctg	ttattgttga	ttctctatgc	6360
cgatttcgct	agatctgttt	agcatgcgtt	gtggttttat	gagaaaatct	ttgttttggg	6420
ggttgcttgt	tatgtgattc	gacccgtgct	tgttggatcg	atctgagcta	attcttaagg	6480
tttatgtgtt	agatctatgg	agtttgagga	ttcttctcgc	ttctgtcgat	ctctcgctgt	6540
tatttttgtt	tttttcagtg	aagtgaagtt	gtttagtctg	aaatgacttc	gtgtatgctc	6600
gattgatctg	gttttaatct	tcgatctgtt	aggtgttgat	gtttacaagt	gaattctagt	6660
gttttctcgt	tgagatctgt	gaagtttgaa	cctagttttc	tcaataatca	acatatgaag	6720
cgatgtttga	gtttcaataa	acgctgctaa	tcttcgaaac	taagttgtga	tctgattcgt	6780
gtttacttca	tgagcttctc	caattcattt	cggtttcatt	ttactttttt	tttagtgaac	6840
catggcgcaa	gttagcagaa	tctgcaatgg	tgtgcagaa	ccatctctta	tctccaatct	6900
ctcgaaatcc	agtcaacgca	aatctccctt	atcggtttct	ctgaagaagc	agcagcatcc	6960
acgagcttat	ccgatttcgt	cgctcgtggg	attgaagaag	agtgggatga	cgtaaatgg	7020
ctctgagctt	cgctctctta	aggtcatgtc	ttctgtttcc	acggcgtgca	tgcttcatgg	7080
agcttcatct	aggccagcta	ctgccaggaa	gtctagcggg	ctcagtggca	ccgtgcgcac	7140
ccctggcgat	aaaagtattt	cacacaggag	cttcatgttc	ggaggacttg	ctagtggaga	7200
gacgagaatc	actgggtttg	ttgagggcga	agatgttatc	aacacccgta	aggcgatgca	7260
agcaatgggt	gccagaatcc	gaaaagaggg	cgatacgtgg	atcatogaag	gtgttggtaa	7320
cggaggattg	ctcgctcccg	aagcgcact	tgactttggg	aacgcagcta	cggggtgcgc	7380
tcttactatg	ggactggtag	gcgtgtatga	ctttgactct	accttcacgc	gtgacgcgag	7440
cctcactaag	agaccaatgg	gacgagtgct	gaatcccttg	aggagatgg	gtgtccaggt	7500
gaaatctgag	gatggtgatc	gtcttcgggt	tactctgcga	ggccccaaga	cccccaagcc	7560
aatcacgtac	agggttccga	tggcgtcagc	acaggtaag	tcagcggta	tcctggcggg	7620
cctcaacaca	cctggaatca	caaocgtgat	tgaaccatc	atgactagag	accacacgga	7680

gaagatgttg cagggtttcg ggcctaactc aacgggtcgaa accgacgccg acggcgtgag	7740
gacaatccgc ttggagggca gaggtaaact gactggccaa gtcacgatg tgcctggaga	7800
tccctcgtec acagcgttcc cctcgttagc tgcgttgctc gtccctggat ctgatgtgac	7860
gatactgaat gtccatcatg atccaactag aaccggcctc atcctcaccat tgcaggagat	7920
gggtgctgac atcgagggtta tcaatcctag gttggcaggt ggagaggatg tggccgatct	7980
gcgcgtgcgt tctagtacac tcaaaggcgt gaccgtccct gaggatcgcg ctccatccat	8040
gacgcacgag taccctattc tcgccgttgc tgcctgcgtt gcgagggcg caactgtaat	8100
gaaaggcctt gaggagttga ggggttaagga gagtgcacgg ctgtccgcgg tggcgaatgg	8160
cctgaagcta aacggcgtgg actgcgacga aggtgaaacg tcccttgtag tccgtggtcg	8220
cccagacggg aaggggttgg ggaatgcttc gggagctgct gtggcgacgc accttgatca	8280
tagaatcgcc atgtcatttc tggatgatgg acttgctctc gagaatccgg tgaccgttga	8340
cgatgctacc atgatcgcca cctcctttcc tgagttcatg gacctcatgg caggcttggg	8400
ggccaagatc gagctgtctg atactaaggc cgcttgaatt cccgatcgtt caaacatttg	8460
gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgcgggtcct gcgatgatta tcatataatt	8520
tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcacgacgt tatttatgag	8580
atgggttttt atgattagag tcccgcatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat	8640
atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcgggtgtca tctatgttac tagatcgggg	8700
atcccacgtg cggaccgcct gcaggccgcg ttatcaagct aactgcaggt ccgatgtgag	8760
acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctccctcgat tccattgccc agctatctgt	8820
cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaagcca tcattgcgat	8880
aaaggaaagg ccacgttga agatgcctct gccgacagt gtcccaaaga tggaccccca	8940
cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat	9000
tgatgtgatg gtccgattga gacttttcaa caaagggtaa tatccgaaa cctcctcgga	9060
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc	9120
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgcgacagt	9180
gggtccaaag atggaccccc acccagagg agcatcgttg aaaaagaaga cgttccaacc	9240
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa	9300
tccactatc cttcgcaaga ccttctctct atataaggaa gttcatttca tttggagagg	9360
accagggtgt accggcgcg caggcctggt agtotgatta attaagcgt cgcgggcct	9420
gatcacctgt cgtacagtat ttctacattt gatgtgtgat ttgtgaagaa catcaaacaa	9480

aacaagcact ggctttaata tgaatgataag tattatggta attaattaat tggcaaaaac 9540
aacaatgaag ctaaaatttt atttattgag ccttgcggtt aatttcttgt gatgatcttt 9600
ttttttattt tctaattata tatagtttcc ttgcttttga aatgctaaag gtttgagaga 9660
gttatgctct tttttcttcc ctctttcttt ttttaacttta tcatacaaat tttgaataaa 9720
aatgtgagta cattgagctc atttaaataa gctt 9754

<210> 14
<211> 1696
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> elemento

<400> 14

caaatttatt atgtgttttt tttccgttgt cgagattgtg tattattctt tegtattac 60
aagacttitta gctaaaattt gaagaattt actttaagaa aatcttaaca tctgagataa 120
tttcagcaat agatttatatt tttcattact ctgacagtat ttttgagat caatcgcaac 180
atatatggtt gttagaataa atgcactata tatakataa ttattttttc atttaaaagt 240
gcatgatata taatatatat atatatatat atgtgtgtgt gtatatggtc aaagaaattc 300
ttatacaaat atacacgaac acatatattt gacaaaatca aagtattaca ctacaacaatg 360
agtttgttgc tggccaaaac aaatatgtag attaaaaatt ccagcctcca aaaaaaaatc 420
caagtgttgt aaagcattat atatatatag tagatcccaa attttgtac aattccacac 480
tgategaatt tttaaagttg aatatctgac gtaggatttt tttaatgtct tacttgacca 540
tttactaata acattcctac gttttcattt gaastatcct ctataattat attgaatttg 600
gcacataata agaaaacctaa ttgtgtattt attttactag taaatttctg gtgatgggct 660
ttctactaga aagctctcgg aaaatcttgg accaaaatcca tattccatga cttcgattgt 720
taacccctatt agttttcaca aacatactat caatatcatt gcaacggaaa aggtacaagt 780
aaaacattca atccgatagg gaagtgatgt aggaggttgg gaagacaggc ccagaaagag 840
atttatctga cttgttttgt gtatagtttt caatgttcat aaaggaaagt ggagacttga 900
gaagtttttt ttggaatttg ttttagcttg ttggcggttt ttttttttga tcaataactt 960
tgttgggctt atgatttgta atattttcgt ggaactttta gtttatttag acgtgctaac 1020
tttgttgggc ttatgacttg ttgtaacata ttgtascaga tgacttgatg tgcgactaat 1080
ctttacacat taaacatagt tctgtttttt gaaagttcct attttcattt ttatttgaat 1140
gttatatatatt tttctatatt tataattcta gtaaaaggca aattttgctt ttaaatgaaa 1200
aaaatatata ttccacagtt tcacctaato ttatgcattt agcagtacaa attcaaaaat 1260

```

ttcccatkttt tattcatgaa tcataccatt atatattaac taaatccaag gtaaaaaaaa 1320
ggkatgaaag ctctatagta agtaaaatat aaattcccca taaggaaaagg gccaaagtcca 1380
ccaggcaagt aaaatgagca agcaccactc caccatcaca caatttcact catagataac 1440
gataagattc atggaattat cttccacgtg gcattattcc agcggttcaa gcgataaagg 1500
gtctcaaacac ctctccttag gcctttgtgg ccgttaccaa gtaaaattaa cctcacacat 1560
atccacactc aaaatccaac ggtgtagatc ctagtccact tgaatctcat gtatcctaga 1620
cctcgcgac cctccaaagc ttgttctcat tgttgttata attatatata gatgacaaa 1680
gcactagacc aaacct                                     1690

```

<210> 15

<211> 1696

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 15

```

caaatttatt atgigttttt tttcogtggc cgagattgtg tattattctt tagttattac 60
aagactttta gctaaaattt gaagaattt actttaagaa aatcttaaca totgagataa 120
tttcagcaat agattatatt tttcattact ctagcagtat ttttgcagat caatcgcaac 180
atatatgggt gttagaaaaa atgcactata tatatatata ttattttttc aattaaaagt 240
gcatgatata taatatatat atatataat atgtgtgtgt gtatatggtc aaagaaatto 300
ttatacaaat atacaogaac acatatattt gacaaaatca aagtattaca ctaaacaatg 360
agttgggtgca tggccaaaac aaatatgtag attaaaaatt ccagcctcca aaaaaaaatc 420
caagtgttgt aaagcattat atatatatag tagatcccaa atttttgtac aattccacac 480
tgatcgaatt tttaaagttg aatatctgac gtaggatttt tttaatgtct tacctgacca 540
tttactaata acattcatac gttttcattt gaaatatcct ctataattat attgaatttg 600
gcacataata agaaacctaa ttggtgattt attttactag taaatttctg gtgatgggct 660
ttctactaga aagctctcgg aaaatcttgg accaaatcca tattccatga cttcgattgt 720
taaccctatt agttttcaca aacatactat caatatcatt gcaacggaaa aggtacaagt 780
aaaacattca atccgatagg gaagtgatgt aggaggttgg gaagacaggc ccagaaagag 840
atttatctga cttgttttgt gtatagtttt caatgttcat aaaggaagat ggagacttga 900
gaagtttttt ttggaatttg tttagctttg ttgggogttt ttttttttga tcaataaact 960
tgttgggctt atgatttgta atattttcgt ggactcttta gtttatttag acgtgctaac 1020
tttgttgggc ttatgaattg ttgtaacata ttgtaacaga tgacttgatg tgcgactaat 1080
ctttacacat taaacatagt tctgtttttt gaaagttcct attttcattt ttatttgaat 1140

```

```

gttatatatt tttctatatt tataattcta gtaaaaggca aattttgctt ttaaatagaa 1200
aaaatatata ttccacagtt tcacctaatc ttatgcattt agcagtacaa attcaaaaat 1260
ttcccathtt tattcatgaa tcataccatt atatattaac taaatccaag gtaaaaaaaa 1320
ggtatgaaag ctctatagta agtaaaatat aaattcccca taaggaaagg gccaaagcca 1380
ccaggcaagt aaaatgagca agcaccactc caccatcaca caatttcact catagataac 1440
gataagattc atggaattat ctccacgtg gcattattcc agcggttcaa gcogataagg 1500
gtctcaaacac ctctccttag gcctttgtgg ccgttaccaa gtaaaattaa cctcacacat 1560
atccacactc aaaatccaac ggtgtagatc ctagtcactc tgaatctcat gtatcctaga 1620
cctccgatac actocaaagc ttgttctcat tgttgttata atttatatata gatgacaaaa 1680
gcactagacc aaacct
1696

```

Lisboa, 14 de maio de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uma célula vegetal de milho com um ADN recombinante estavelmente integrado no seu genoma compreendendo um promotor que é funcional em células vegetais e que está operativamente ligado ao ADN que codifica para uma proteína com uma identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 90% relativamente ao comprimento total de SEQ ID NO: 5, em que uma planta de milho compreendendo a referida célula vegetal de milho apresenta um rendimento melhorado em comparação com plantas de controlo que não têm o referido ADN recombinante através do rastreio de plantas que são regeneradas de células de plantas na referida população para um rendimento melhorado em comparação com plantas de controlo que não têm o referido ADN recombinante.

2. A célula vegetal de milho da reivindicação 1, em que a referida proteína compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5.

3. A célula vegetal da reivindicação 1 ou 2 compreendendo ainda ADN que expressa para uma proteína que proporciona tolerância à exposição a um herbicida aplicado em níveis que são letais para um tipo nativo da referida célula vegetal.

4. A célula vegetal da reivindicação 3, em que o agente do referido herbicida é um composto glifosato, dicamba, o glufosinato.

5. A célula vegetal de milho da reivindicação 1 ou 2, em que a referida proteína compreende um domínio "Homeobox" e um domínio HALZ.

6. Uma planta transgênica de milho ou uma semente de milho transgênico compreendendo uma pluralidade da célula vegetal da reivindicação 1 ou 2.

7. A planta de milho transgênica da reivindicação 6, que é homozigótica para o referido ADN recombinante.

8. A semente de milho transgênico da reivindicação 6, que é uma semente de milho transgênico, não natural, que pode produzir plantas de milho que são resistentes à doença do vírus Mal de Rio Cuarto ou do fungo *Puccinia sorghi* ou ambas.

9. A planta de milho da reivindicação 6, em que a referida proteína compreende um domínio "Homeobox" e um domínio HALZ.

10. Um grão de pólen transgênico compreendendo um derivado haplóide de uma célula de planta da reivindicação 1 ou 2 e compreendendo o ADN recombinante tal como referido na reivindicação 1 ou 2.

11. Esta invenção também proporciona métodos para o fabrico de uma semente não-natural, transgênica que

pode ser usada para produzir uma planta transgénica de milho da reivindicação 6, compreendendo o método para o fabrico da referida semente:

- (a) rastreio de uma população de plantas para o referido rendimento melhorado e o referido ADN recombinante, em que plantas individuais na referida população podem apresentar o referido rendimento a um nível inferior do que, essencialmente o mesmo que, ou maior do que o nível como que a referida característica é apresentada em plantas de controlo que não expressam o ADN recombinante,
- (b) seleccionar a partir da referida população uma ou mais plantas que apresentam a característica a um nível superior do que o nível com que a referida característica é apresentada em plantas de controlo,
- (c) verificar que o referido ADN recombinante está integrado de forma estável nas referidas plantas seleccionadas,
- (d) analisar o tecido de uma planta seleccionada para determinar a produção de uma proteína que tem a função de uma proteína codificada pelos nucleótidos numa sequência de SEQ ID NO: 1; e
- (e) recolher sementes de uma planta seleccionada.

12. Um método da reivindicação 11 em que

- (i) as plantas na referida população compreendem ainda ADN que expressa uma proteína que proporciona tolerância à exposição a um herbicida aplicado a níveis que são letais para as células do tipo nativo e em que a referida selecção é efectuada tratando a referida população com o referido herbicida, preferentemente o referido herbicida compreende um composto glifosato, dicamba, ou glufosinato; ou

(ii) a referida selecção é efectuada pela identificação de plantas com a característica melhorada.

13. Uma semente de milho híbrido compreendendo uma pluralidade de células vegetais da reivindicação 1 ou 2 que pode ser obtida por um método compreendendo:

(a) aquisição de sementes de milho híbrido a partir de uma planta de milho tolerante a herbicida da reivindicação 6;

(b) produção de plantas de milho a partir da referida semente de milho híbrido, em que uma fracção das plantas produzidas a partir da referida semente de milho híbrido é homozigótica para o referido ADN recombinante, uma fracção das plantas produzidas a partir da referida semente de milho híbrido é hemizigótica para o referido ADN recombinante, e uma fracção de plantas produzidas a partir da referida semente de milho híbrido não tem nenhum do referido ADN recombinante;

(c) seleccionar plantas de milho que são homozigóticas e hemizigóticas para o referido ADN recombinante, pelo tratamento com um herbicida;

(d) recolha de sementes a partir de plantas de milho sobreviventes tratadas com herbicida e plantar a referida semente para produzir novas plantas de milho descendentes;

(e) repetir os passos (c) e (d) pelo menos uma vez para produzir uma linhagem de milho endogâmica;

(f) cruzar a linhagem de milho endogâmica com uma segunda linhagem de milho para a produção de sementes híbridas.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patentes citadas na Descrição

- | | |
|---------------------|--------------------|
| • US 20040019927 A | • US 5250515 A |
| • US 5858742 A | • US 5880275 A |
| • US 5322938 A | • US 6506589 A |
| • US 5641875 A | • US 5986175 A |
| • US 20020192813 A1 | • US 20030150017 A |
| • US 20040216189 A | • US 4196285 A |
| • US 20030131377 A | • US 5015580 A |
| • US 5593874 A | • US 5550318 A |
| • US 5420034 A | • US 5538680 A |
| • US 6433252 B | • US 5914451 A |
| • US 6090627 A | • US 6160208 A |
| • US 20020192813 A | • US 6399661 B |
| • US 5188642 A | • US 6153812 A |
| • US 5728925 A | • US 5159135 A |
| • US 5094945 A | • US 5824677 A |
| • US 5627061 A | • US 5591616 A |
| • US 5633435 A | • US 6384301 B |
| • US 6040497 A | • US 4959317 A |
| • US 6463175 A | • US 5527695 A |
| • US 20030083480 A | • US 6194636 B |
| • US 20030135879 A | • US 6232526 B |
| • US 4810648 A | • US 5760708 A |
| • US 2003010609 A | • US 6118047 A |
| • US 6107549 A | • US 6399661 A |
| • US 6378754 B | • US 60660320 B |
| • US 20020112260 A | |

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|---|--|
| • S.R. EDDY, Profile Hidden Markov Models, <i>Bioinformatics</i> , 1998, vol. 14, 755-763 | • KLEE, H.J. et al. <i>MGG</i> , 1987, vol. 210, 437-442 |
| • FISCHHOFF et al. <i>Plant Mol Biol.</i> , 1992, vol. 20, 81-93 | • MISAWA et al. <i>Plant J.</i> , 1993, vol. 4, 833-840 |
| • TANIGUCHI et al. <i>Plant Cell Physiol.</i> , 2000, vol. 41 (1), 42-48 | • MISAWA et al. <i>Plant J.</i> , 1994, vol. 6, 481-489 |
| • RUSSELL et al. <i>Transgenic Res.</i> , 1997, vol. 6 (2), 157-166 | • SATHASIVAN et al. <i>Nucl. Acids Res.</i> , 1990, vol. 18, 2188-2193 |
| • BELANGER et al. <i>Genetics</i> , 1991, vol. 129, 863-872 | • DEBLOCK et al. <i>EMBO J.</i> , 1987, vol. 6, 2513-2519 |
| • STACY et al. <i>Plant Mol Biol.</i> , 1996, vol. 31 (6), 1206-1216 | • Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 |
| | • AN et al. <i>Plant Cell</i> , 1989, vol. 1, 115-122 |