



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122017006335-9 B1



(22) Data do Depósito: 18/07/2007

(45) Data de Concessão: 26/06/2018

(54) Título: MÉTODO DE AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTA MEDIADA POR BACTÉRIA CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE E CÉLULA BACTERIANA TRANSGÊNICA

(51) Int.Cl.: C12N 15/82

(30) Prioridade Unionista: 19/07/2006 US 60/831,814

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): XUDONG YE; LARRY GILBERTSON

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO DE AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTA MEDIADA POR BACTÉRIA CONSTRUÇÃO DE DNA RE-COMBINANTE E CÉLULA BACTERIANA TRANSGÊNICA".

[001] Dividido do PI0714888-7, depositado em 18.07.2007

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O presente pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 60/831.814 depositado em 19 de julho de 2006, cuja revelação é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

1. Campo da Invenção

[003] A presente invenção refere-se em geral à biotecnologia de planta. Mais especificamente, a invenção refere-se a métodos e composições para melhora da eficiência de transformação de planta mediada por bactéria.

2. Descrição da Técnica Relacionada

[004] Durante a transformação de células de planta mediada por *Agrobacterium* natural, um pedaço de DNA do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* ou plasmídeo Ri de *A. rhizogenes* é transferido para a célula da planta (por exemplo, Gelvin, 2003). Este fragmento de DNA transferido (T-DNA) é flanqueado por repetições diretas de 24 pb imperfeitas que são reconhecidas pela endonuclease de *Agrobacterium* VirD2 produzir um filamento T de filamento único ao fazer uma fenda (*nicking*) em um sítio específico em um filamento de cada repetição. A repetição que inicia formação de filamento T de filamento único foi chamada a "borda da direita" (RB), enquanto a formação de terminação de repetição de T-DNA de filamento único foi chamada a "borda da esquerda" (LB). A proteína VirD2 é ligada à extremidade 5' do filamento após fazer a fenda, e guia o filamento T em células de planta onde o filamento T é integrado ao genoma da planta com a ajuda de

outras proteínas codificadas por *Agrobacterium* e planta. Sequências a jusante (em uma direção 5' a 3') da região T-DNA, incluindo sequência de estrutura principal de vetor, podem ser também transferidas (por exemplo, Kononov e outros, 1997). Isto provavelmente acontece por formação de fenda ineficiente de pelo menos uma das bordas em *Agrobacterium* antes de transferir para uma célula de planta.

[005] Comparação das sequências RB e LB de uma variedade de linhagens de *Agrobacterium* indica que ambas RB e LB compartilham um motivo de consenso (Canaday e outros, 1992), que indica que outros elementos podem estar envolvidos em modulação da eficiência de processamento de RB. Sequências de ação *cis* próximas da RB estão presentes em muitas linhagens de *Agrobacterium*, incluindo *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*. Essas sequências são necessárias para virulência do tipo selvagem (Veluthambi e outros, 1988; Shuvington e Ream, 1991; Toro e outros, 1989; Toro e outros, 1988; Hansen e outros 1992). A sequência em *A. tumefaciens* foi chamada "overdrive" ou "intensificador de transmissão de T-DNA" por Peralta e outros (1986). Em *A. rhizogenes* a sequência foi chamada a "sequência estimuladora de transferência de T-DNA" (TSS) por Hansen e outros (1992). A sequência de overdrive ("OD") foi inicialmente definida como um motivo de 24 pb particular imediatamente em frente da repetição da RB de TL-DNA Ti octopina (Peralta e outros, 1986). Uma sequência similar está presente em frente da repetição da RB da borda direita de TR-DNA Ti octopina e também em frente RB Ti nopalina e borda da direita TL Ri agropina (Peralta e outros, 1986, Shaw e outros, 1984, Barker e outros, 1983, Slighton e outros, 1985). Comparação adicional de linhagens *A. tumefaciens* diferentes revelou uma sequência de núcleo de sobreposição de 8 pb presente em frente a todas as sequências da borda da direita incluindo linhagem de nopalina pTiT37, linhagem de octopina pTiA6 e pRiA4 de *A. rhizogenes* (Peralta e outros, 1986).

[006] A presença de sequência de overdrive de octopina aumentou a formação de T-DNA de filamento único em células de *Agrobacterium* e melhorou a transferência de T-DNA para células de planta, e era necessária para virulência do tipo selvagem (Peralta e outros, 1986, Shurvinton e Ream, 1991). A repetição da LB de plasmídeo Ti de produção de nopalina pTiT37 é capaz de produzir T-DNA de filamento único com alta eficiência quando a sequência de ação *cis* proximal da RB pTiT37 foi posta em frente a ela, indicando que uma sequência tipo overdrive na verdade também está presente em um plasmídeo Ti nopalina (Culianez-Macia e Hepburn, 1988, Peralta e outros, 1986), igual ao que está nos outros plasmídeos Ti identificados (produção de octopina). Integração de uma sequência de overdrive de octopina heteróloga em frente da RB de pTiT37 nopalina resultou em virulência muito maior do que a linhagem de origem que continha apenas uma repetição da RB de pTiT37 (Peralta e outros, 1986).

[007] A proteína VirC1 se liga à overdrive e é pensada melhorar a formação de fenda de VirD2 (Toro e outros, 1988, 1989), enquanto mutação de *virC* resulta em virulência atenuada em plantas (Close e outros, 1987) e produção reduzida de sequência de T-DNA de filamento único processada. Ambos plasmídeos Ti octopina e nopalina de *A. tumefaciens* contêm *VirC* e podem complementar a mutação *virC* *in trans* para restaurar a virulência atenuada para nível do tipo selvagem (Close e outros, 1987).

[008] A TSS encontrada em linhagens de *A. rhizogenes* 8196, A4 e 2659 desempenha um papel similar à sequência de overdrive em *A. tumefaciens*. Cada linhagem de *A. rhizogenes* tem uma sequência diferente, mas relacionada (Hansen e outros, 1992). A sequência de núcleo de TSS de 8 pb repete 5 vezes em pRiA4, 6 vezes em pRi8196 e 17 vezes (ao invés de 16x como Hansen e outros, 1992) em pRi2659 (No. De Acesso GenBank AJ271050). pRiA4 tem uma sequência de

núcleo de overdrive de 8 pb conservada em adição às repetições. Repetições de sequência de núcleo mais curtas em pRiA4 e pRi8196 não foram suficientes para virulência do tipo selvagem (Hansen e outros, 1992).

[009] Depicker e outros (Publicação de Patente U.S. 2003/0140376 e publicação internacional correspondente WO01/44482) descrevem construções combinantes com bordas de T-DNA modificadas a fim de diminuir ou prevenir transferência de sequências de estrutura principal de vetor. Conner e outros (WO05/121346) descrevem criação e uso de sequências de regiões do tipo borda de T-DNA que compreendem sequências derivadas de plantas. Heim e outros (Publ. U.S. 2003/0188345) descrevem vetores para transformação mediada por *Agrobacterium* de plantas com regiões de borda modificadas. Lassner e outros (Publ. U.S. 2006/0041956) descreve modificações de regiões de borda de T-DNA para permitir identificação de eventos transgênicos que não compreendem sequências não-T-DNA.

[0010] Embora os estudos acima tenham aumentado a compreensão na técnica, o que é ainda necessário é um método para melhora da eficiência de transformação de planta mediada por *Agrobacterium*. Embora a presença de sequências de overdrive ou TSS aumente virulência de *Agrobacterium* do tipo selvagem e melhore a transferência de T-DNA para células de planta comparado com plasmídeos sem as sequências, ainda permanece obscuro como melhorar mais a eficiência de transformação incluindo através do uso de sequências de overdrive ou TSS.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] Em um aspecto, a invenção provê um método de aumento da eficiência de transformação de planta mediada por bactéria compreendendo as etapas de: introdução de pelo menos uma sequência

intensificadora de transformação adicional em um vetor de transformação de planta compreendendo pelo menos uma região de borda de T-DNA; e b) transformação de uma célula de planta com o vetor através de transformação mediada por bactéria, onde a bactéria é competente para a transformação da célula de planta. O método pode opcionalmente compreender regeneração de uma planta transgênica a partir da célula de planta. Em uma modalidade, a sequência intensificadora de transformação adicional compreende uma sequência de núcleo consenso de TGTWTGTK (SEQ ID NO:20). Em outras modalidades, a sequência intensificadora de transformação adicional é selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 e uma sequência complementar a qualquer uma da SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 ou SEQ ID NO:13. Em modalidades particulares, a invenção provê uma construção de DNA recombinante compreendendo SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 ou SEQ ID NO:16.

[0012] A sequência intensificadora de transformação usada com a invenção pode estar localizada próximo à região ou sequência de borda de T-DNA, tal como a sequência da borda da direita (RB), isto é, entre a sequência de flanqueamento tal como sequência de vetor e a sequência de borda. A sequência intensificadora de transformação pode ser de um plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, tal como um plasmídeo nopalina ou octopina, ou pode ser de um plasmídeo Ri de *A. rhizogenes*. Em certas modalidades, uma transformação mediada por bactéria pode utilizar uma técnica selecionada de transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação mediada por *Rhzobium* e transformação mediada por *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Em certas modalidades, a sequência intensificadora de transformação pode compreender SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:17 ou SEQ ID NO:18. Em modalidades adicionais, a região de borda de T-

DNA pode compreender de a partir de 1 a cerca de 18 cópias da sequência intensificadora de transformação, incluindo de a partir de cerca de 2 ou cerca de 4 a cerca de 18 cópias da sequência intensificadora de transformação.

[0013] Uma célula de planta de acordo com a invenção pode ser qualquer célula de planta. Em certas modalidades, a célula de planta é de uma planta selecionada do grupo consistindo em soja, milho, algodão, canola, arroz, trigo, alfafa, feijão comum, milho, tabaco, girassol, cevada, beterraba, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, repolho Chinês, pepino, berinjela, alho-poró, alface, melão, aveia, cebola, ervilha, pimenta, milho, batata, abóbora, rabano, sorgo, espinafre, abóbora, beterraba, tomate e melancia. Em modalidades particulares, a célula de planta é uma célula de milho ou uma célula de soja.

[0014] Em outro aspecto, a invenção provê uma construção de DNA recombinante compreendendo uma sequência de borda de T-DNA de um plasmídeo Ti ou Ri, operavelmente ligado a uma sequência intensificadora de transformação que compreende duas ou mais cópias de uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13, uma sequência complementar a qualquer uma da SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 ou SEQ ID NO:13 e combinações das mesmas. Em modalidades particulares, a invenção provê uma construção de DNA recombinante compreendendo SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 ou SEQ ID NO:16.

[0015] Em tal construção, a sequência intensificadora pode compreender pelo menos cerca de quatro cópias da sequência. A sequência de borda pode ser uma sequência de borda da direita (RB) ou borda da esquerda (LB). Em certas modalidades, a construção pode compreender SEQ ID NO:10 e/ou SEQ ID NO:11. A sequência de RB pode ser de um plasmídeo Ti nopalina, um plasmídeo Ti ou Ri agropi-

na, manopina, succimanopina, cucumopina ou octopina e pode compreender SEQ ID NO:12.

[0016] Em outro aspecto, a invenção provê uma célula transformada com uma construção provida aqui. A célula pode ser uma célula de planta ou bacteriana, incluindo uma célula de *Agrobacterium* e *Rhizobium*. Em uma modalidade, a célula de planta é de uma planta selecionada do grupo consistindo em soja, milho, algodão, canola, arroz, trigo, alfafa, feijão comum, milho, tabaco e girassol. A invenção também provê plantas transgênicas transformadas com uma construção da invenção. Em modalidades particulares, a planta transgênica pode ser selecionada do grupo consistindo em soja, milho, algodão, canola, arroz, trigo, alfafa, feijão comum, milho, tabaco e girassol.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] Os desenhos que seguem são parte do presente relatório e estão incluídos para demonstrar mais certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor compreendida com referência aos desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas aqui.

[0018] FIGURA 1: Mostra de várias sequências intensificadoras de transformação usadas para melhora da eficiência de transformação.

[0019] FIGURA 2: Mapa esquemático de pMON87464.

[0020] FIGURA 3: Mapa esquemático de pMON87465.

[0021] FIGURA 4: Sequências da RB engenheiradas; sequência de overdrive em negrito e a sequência de núcleo da RB de 24 pb sublinhada. (A) Sequência de overdrive da RB+1x de nopalina (SEQ ID NO:14); (B) overdrive da RB+4x de nopalina (SEQ ID NO:15); (C) RB+18x TSS de nopalina (SEQ ID NO:16).

DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE REFERÊNCIA

[0022] SEQ ID NO:1 *Primer* avançado Xd463 para prepara-

ção da sequência OD 2X.

- [0023] SEQ ID NO:2 *Primer reverso Xd464 para preparação da sequência OD2X.*
- [0024] SEQ ID NO:3 *Primer avançado Xd465 para preparação da sequência TSS 6X.*
- [0025] SEQ ID NO:4 *Primer reverso Xd466 para preparação de sequência TSS 6X.*
- [0026] SEQ ID NO:5 *núcleo de OD de 24 pb de pTiA6.*
- [0027] SEQ ID NO:6 *sequência de 8 pb de TSS 1x.*
- [0028] SEQ ID NO:7 *OD 1x de 30 pb de pTiA6; complemento reverso de SEQ ID NO:17.*
- [0029] SEQ ID NO:8 *sequência OD 1X de pTiAB3.*
- [0030] SEQ ID NO:9 *OD 1X de pTi15955.*
- [0031] SEQ ID NO:10 *OD empilhada 4X.*
- [0032] SEQ ID NO:11 *TSS empilhada 18X .*
- [0033] SEQ ID NO:12 *Região de borda com sequência OD 1X.*
- [0034] SEQ ID NO:13 *Sequência OD parcial.*
- [0035] SEQ ID NO:14 *Região da RB de Nopalina com OD 1X.*
- [0036] SEQ ID NO:15 *Região da RB de Nopalina com OD 4X.*
- [0037] SEQ ID NO:16 *Região da RB de nopalina com TSS 18X.*
- [0038] SEQ ID NO:17 *OD 1X; complemento reverso de SEQ ID NO:7.*
- [0039] SEQ ID NO:18 *OD empilhada 4X; complemento reverso da SEQ ID NO:10.*
- [0040] SEQ ID NO:19 *Sequência OD consenso (Toro e outros, 1988).*
- [0041] SEQ ID NO:20 *Sequência OD de núcleo de 8 pb consenso.*

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0042] O que segue é uma descrição detalhada da invenção provida para auxiliar aqueles versados na técnica na prática da presente invenção. Aqueles de habilidade comum na técnica podem fazer modificações e variações nas modalidades descritas aqui sem se afastar do espírito ou escopo da presente invenção.

[0043] A invenção provê métodos e composições para melhora da eficiência de transformação mediada por *Agrobacterium* de células de planta. Sequenciamento da região T-DNA de 20 kb de *A. rhizogenes* K599, uma linhagem supervirulenta de soja, levou ao reconhecimento que o plasmídeo pRi em *A. rhizogenes* K599 é idêntico à linhagem NCPBB 2659 de *A. rhizogenes*. A supervirulência da linhagem K599 pode então ser relacionada com o número de sequências TSS presentes próximo à RB. Então, empilhamento de repetições de overdrive e TSS múltiplas foi testado em vetores binários com uma RB de nopalina (por exemplo, de pTiT37) para melhorar eficiência de transformação. A overdrive de 30 pb de plasmídeo Ti octopina (Shurvinton e Ream, 1991) de pTiA6, presente em 4 cópias, e a sequência de núcleo de 8 pb de NCPBB2659 TSS de *A. rhizogenes*, presente em 18 cópias, foram usadas para intensificar a eficiência de transmissão de DNA.

[0044] Estudos de transformação comparando o uso de construções contendo números variáveis de sequências de overdrive e TSS demonstraram que a presença de cópias "empilhadas" adicionais dessas sequências melhorou a eficiência de transformação melhorando a frequência de transformação bem como a qualidade dos eventos transgênicos resultantes. Por exemplo, a proporção de eventos com inserções de cópia única, e também falta de sequências de estrutura principal de vetor (por exemplo, *oriV*), foi aumentada. Frequência de transformação aumentada e eventos de qualidade melhoraram a eficiência geral do processo de transformação ao reduzirem a quantidade de recursos requeridos para selecionar evento para desenvolvimento

comercial adicional.

[0045] A invenção então provê métodos aperfeiçoados para obtenção de plantas transgênicas férteis e para a transformação de células ou tecidos de planta e regeneração das células ou tecidos transformados em plantas transgênicas férteis. Para iniciar um processo de transformação de acordo com a invenção, os componentes genéticos desejados ser inseridos nas células ou tecidos de planta serão primeiro selecionados. Componentes genéticos podem incluir qualquer ácido nucléico que seja introduzido em uma célula ou tecido de planta usando o método de acordo com a invenção. Componentes genéticos podem incluir DNA de não-planta, DNA de planta ou DNA sintético.

[0046] Em certas modalidades da invenção, componentes genéticos são incorporados a uma composição de DNA tal como um plasmídeo de filamento duplo, recombinante, ou molécula de vetor comprendendo componentes genéticos tal como: (a) um promotor que funciona em células de planta para causar a produção de uma sequência de RNA, (b) uma sequência de DNA estrutural que causa a produção de uma sequência de RNA que codifica uma proteína ou polipeptídeo desejado e (c) uma sequência de DNA não-traduzida 3' que funciona em células de planta para causar a poliadenilação da extremidade 3' da sequência de RNA. O vetor pode também conter componentes genéticos que facilitam a transformação e regulam expressão do(s) gene(s) desejado(s).

[0047] Os componentes genéticos são tipicamente orientados de modo a expressarem um mRNA, que em uma modalidade pode ser traduzido em uma proteína. A expressão de uma sequência de codificação estrutural de uma planta (um gene, cDNA, DNA sintético ou outro DNA) que existe em forma de filamento duplo envolve transcrição de RNA mensageiro (mRNA) de um filamento do DNA através de RNA polimerase e subsequente processamento do transcrito primário de

mRNA dentro do núcleo. Este processo envolve uma região 3' não-traduzida que inclui poliadenilação das extremidades 3' do mRNA.

[0048] Métodos gerais para preparação de plasmídeos ou vetores que contêm componentes genéticos desejados e podem ser usados para transformar plantas e métodos de fabricação desses vetores são conhecidos na técnica. Vetores tipicamente consistem em vários componentes genéticos, incluindo, mas não limitado a, elementos reguladores tal como promotores, líderes, ítrons e sequências terminadoras. Elementos reguladores são também referidos como elementos reguladores cis ou trans, dependendo da proximidade dos elementos com as sequências ou gene(s) que eles controlam. A região promotora contém uma sequência de bases que sinaliza RNA polimerase para associar com o DNA e iniciar uma transcrição em mRNA usando um dos filamentos de DNA como um molde para fazer um filamento de RNA complementar correspondente.

[0049] As construções podem também conter os segmentos de DNA de estrutura principal de plasmídeo que proveem função de replicação e seleção de antibiótico em células bacterianas, por exemplo, uma origem de replicação de *Escherichia coli* tal como *ori*322, uma origem de replicação de faixa de hospedeiro ampla tal como *oriV* ou *oriRi*, e uma região de codificação para um marcador selecionável tal como Spec/Strp que codifica Tn7 aminoglicosídeo adeniltransferase (*aadA*) conferindo resistência à espectinomicina ou estreptomicina, ou um gene marcador selecionável de gentamicina (Gm, Gent). Para transformação de planta, a linhagem bacteriana hospedeiro é frequentemente ABI, C58, LBA4404, EHA101 e EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* carregando um plasmídeo tendo uma função de transferência para a unidade de expressão. Outras linhagens bacterianas conhecidas daqueles versados na técnica de transformação de planta podem funcionar na presente invenção, incluindo linhagens *A. rhizo-*

genes, *Sinorhizobium* sp., *Mesorzhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium* sp.

[0050] Vários promotores que são ativos em células de planta foram descritos na literatura. Tais promotores incluem, mas não estão limitados a, promotores de nopalina sintase (NOS) e octopna sintase (OCS), que são carregados em plasmídeos de indução de tumor de *A. tumefaciens*; os promotores do caulimovírus tal como promotores do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 19S e 35S e o promotor do vírus do mosaico da escrofulária (FMV) 35S; o promotor CaMV35S intensificado (e35S); e o promotor induzível por luz da subunidade pequena de ribulose bifosfato carboxilase (ssRUBISCO, um polipeptídeo de planta muito abundante). Todos esses promotores têm sido usados para criar vários tipos de construções de DNA que foram expressos em plantas. Híbridos de promotor podem ser também construídos para aumentar a atividade transcripcional ou combinar atividade transcripcional, inducibilidade e especificidade de tecido ou desenvolvimental desejadas.

[0051] Então, promotores que funcionam em plantas podem ser induzíveis, virais, sintéticos, constitutivos conforme descrito, temporalmente regulados, espacialmente regulados e/ou espaço-temporalmente regulados. Outros promotores que são aumentados em tecido, específicos de tecido ou desenvolvimentalmente regulados são também conhecidos na técnica e pretendidos ter utilidade na prática da presente invenção. Promotores úteis podem ser obtidos de uma variedade de fontes tal como plantas e vírus de DNA de planta. É preferido que o promotor particular selecionado deva ser capaz de causar expressão suficiente para resultar na produção de uma quantidade eficaz do produto de gene de interesse.

[0052] Os promotores usados nos construções de DNA (isto é, genes de planta químéricos/recombinantes) da presente invenção podem

ser modificados, se desejado, para afetar suas características de controle. Promotores podem ser derivados por meio de ligação com regiões operadoras, mutagênese aleatória ou controlada, etc. Ainda, os promotores podem ser alterados para conter "sequências intensificadoras" múltiplas para auxiliar na elevação da expressão de gene.

[0053] O mRNA produzido por uma construção de DNA da presente invenção pode também conter uma sequência líder não-traduzida 5'. Esta sequência pode ser derivada do promotor selecionado para expressar o gene e pode ser especificamente modificada de modo a aumentar a tradução do mRNA. As regiões não-traduzidas 5' podem ser também obtidas de RNAs virais, de genes eucarióticos adequados ou de uma sequência de gene sintético. Tais sequências "intensificadoras" podem ser desejadas para aumentar ou alterar a eficiência de tradução do mRNA recombinante e são geralmente conhecidas como intensificadores traducionais. Outros componentes genéticos que servem para intensificar a expressão ou afetar transcrição ou tradução de um gene são também pretendidos como componentes genéticos. A região não-traduzida 3' dos construções quiméricos de preferência contém um terminador transcripcional, ou um elemento tendo função equivalente, e um sinal de poliadenilação, que funciona em plantas para poliadenilar a extremidade 3' do RNA. Exemplos de regiões 3' adequadas são (1) as regiões não-traduzidas, transcritas, 3', contendo o sinal de poliadenilação de genes de plasmídeo (Ti) de indução de tumor de *Agrobacterium*, tal como o gene de nopalina sintase (*nos*) e (2) genes de planta tal como os genes de proteína de armazenamento de soja e a subunidade pequena do gene de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (ssRUBISCO). Um exemplo de uma região 3' preferida é aquela do gene de ssRUBISCO E9 de ervilha.

[0054] Tipicamente, sequências de DNA localizadas algumas centenas de pares de base a jusante do sítio de poliadenilação servem

para terminar transcrição. Essas sequências de DNA são referidas aqui como regiões de terminação de transcrição. As regiões são requeridas para poliadenilação eficiente de RNA mensageiro transcrito (mRNA) e são conhecidas como regiões não-traduzidas 3'. Polimerase de RNA transcreve uma sequência de DNA de codificação através de um sítio onde poliadenilação acontece.

[0055] Em muitos sistemas de transformação, é preferido que o vetor de transformação contenha um gene marcador selecionável, avaliável ou classificável. Esses componentes genéticos são também aqui referidos como componentes genéticos funcionais, uma vez que eles produzem um produto que serve uma função na identificação de uma planta transformada, ou um produto de utilidade desejada.

[0056] O DNA que serve como um dispositivo de seleção pode funcionar em um tecido de planta regenerável para produzir um composto que confere ao tecido da planta resistência a um composto de outro modo tóxico. Genes de interesse para uso como um marcador selecionável, avaliável ou classificável incluiriam, mas não estão limitados a, β -glucuronidase (*gus*), proteína fluorescente verde (*gfp*), luciferase (*lux*), antibióticos tal como canamicina (Dekeyser e outros, 1989), genes que permitem a tolerância a herbicidas tal como glifosato (Della-Cioppa e outros, 1987), tal como CP4 EPSPS (Patente U.S. 5.627.061; Patente U.S. 5.633.435; Patente U.S. 6.040.497; Patente U.S. 5.094.945; WO 04/074443; WO04/009761); glifosinato (Patente U.S. 5.646.024, Patente U.S. 5.561.236, Patente U.S. 5.276.268; Patente U.S. 5.637.489; Patente U.S. 5.273.894); 2,4-D (WO05/10743) e dicamba, tal como DMO (Patente U.S. 7.022.896). Outros métodos de seleção podem ser também implementados incluindo, mas não limitando a, tolerância à fosfinotricina, bialafos e mecanismos de seleção positivos (Joersbo e outros, 1998) e ainda se encaixariam no escopo da presente invenção. Exemplos de vários marcadores selecioná-

veis/avaliáveis/classificáveis e genes codificando-os são revelados em Miki e McHugh (2004).

[0057] A presente invenção pode ser usada com qualquer plasmídeo ou vetor de transformação de planta adequado contendo um marcador selecionável ou avaliable e elementos reguladores associados conforme descrito, junto com um ou mais ácidos nucléicos (um gene estrutural de interesse) expressos de uma maneira suficiente para conferir uma característica desejável particular. Exemplos de genes estruturais adequados de interesse previstos pela presente invenção incluem, mas não estão limitados a, genes para tolerância a inseto ou peste, genes para tolerância a herbicida, genes para aperfeiçoamentos em qualidade tal como rendimento, melhorias nutricionais, tolerâncias ambientais ou a estresse, ou genes para quaisquer mudanças desejáveis em fisiologia de planta, crescimento, desenvolvimento, morfologia ou produto(s) de planta.

[0058] Alternativamente, as sequências codificando DNA podem afetar esses fenótipos através da codificação de uma molécula de RNA não-traduzível que causa a inibição direcionada de expressão de um gene endógeno, por exemplo, através de mecanismos mediados por RNA de filamento duplo, incluindo mecanismos mediados por antissenso e co-supressão (vide, por exemplo, Bird e outros, 1991). O RNA poderia ser também uma molécula de RNA catalítico (isto é, uma ribozima) engenheirada para clivar um produto de mRNA endógeno desejado (vide, por exemplo, Gibson e Shillitoe, 1997). Mais particularmente, para uma descrição de regulagem de antissenso de expressão de gene em células de planta vide Patente U.S. Nº 5.107.065 e para uma descrição de supressão de gene em plantas através de transcrição de um dsRNA vide Patente U.S. Nº 6.506.559, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2002/0168707 A1 e Pedidos de Patente U.S. Nos. de Série 09/423.143 (vide WO 98/53083), 09/127.735 (vide

WO 99/53050) e 09/084.942 (vide WO 99/61631), todos aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

[0059] Uso de sequências que resultam em silenciamento de outros genes endógenos (por exemplo, tecnologias RNAi incluindo miRNA) para resultar em um fenótipo é também previsto. Por exemplo, RNAi pode ser usado para silenciar um ou mais genes resultando em um fenótipo classificável. Uma modalidade é montar um cassete de DNA que vai transcrever uma repetição de sequências revertida, para produzir um RNA de filamento duplo (dsRNA), tipicamente pelo menos cerca de 19-21 pb de comprimento e correspondendo a uma porção de um ou mais genes direcionados para silenciamento. Então, qualquer gene que produza uma proteína ou mRNA que expresse uma mudança de fenótipo ou morfologia de interesse é útil para a prática da presente invenção.

[0060] Ácidos nucléicos exemplares que podem ser introduzidos através dos métodos compreendidos pela presente invenção incluem, por exemplo, sequências de DNA heterólogo, isto é, sequências ou genes de outras espécies, ou até mesmo genes ou sequências que se originam com ou estão presentes na mesma espécie, mas são incorporados em células recipientes através de métodos de engenharia genética ao invés de técnicas de reprodução ou geração clássicas. O termo heterólogo, no entanto, pretende também se referir a genes que não estão normalmente presentes na célula sendo transformada ou a genes que não estão presentes na forma, estrutura, etc, conforme encontrado no segmento de DNA transformante ou a genes que estão normalmente presentes, mas uma expressão diferente é desejável. Então, o termo gene ou DNA "heterólogo" pretende se referir a qualquer gene ou segmento de DNA que é introduzido em uma célula reciente, sem importar se um gene similar pode já estar presente em tal célula. O tipo de DNA incluído no DNA heterólogo pode incluir DNA

que já está presente na célula de planta, DNA de outra planta, DNA de um organismo diferente ou DNA geralmente externo, tal como uma sequência de DNA contendo uma mensagem de antissenso de um gene, ou uma sequência de DNA codificando uma versão sintética ou modificada de um gene ou sequência.

[0061] À luz da presente revelação, vários outros genes marcadores selecionáveis ou avaliáveis, elementos reguladores e outras sequências de interesse possíveis estarão aparentes àqueles de habilidade na técnica. Então, a discussão acima pretende ser exemplar ao invés de exaustiva.

[0062] Após a construção do vetor ou construção de transformação de planta, a molécula de ácido nucléico, preparada como uma composição de DNA *in vitro*, é geralmente produzida em um hospedeiro adequado tal como *Escherichia coli* e empareirada em outro hospedeiro adequado tal como *Agrobacterium* ou *Rhizobium*, ou diretamente transformada em *Agrobacterium* ou *Rhizobium* competente. Essas técnicas são bem conhecidas daqueles de habilidade no campo e foram descritas para vários sistemas de planta incluindo soja, algodão e trigo (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.569.834 e 5.159.135 e WO 97/48814). Aqueles de habilidade na técnica reconheceriam a utilidade de métodos de transformação mediados por *Agrobacterium*. Linhagens podem incluir, mas não estão limitadas a, derivados desarmados de linhagem *A. tumefaciens* C58, uma linhagem de nopalina que é usada para mediar a transferência de DNA em uma célula de planta; linhagens de octopina, tal como LBA4404; ou linhagens de agropina, por exemplo, EHA101, EHA105 ou *R. leguminosarum* USDA2370 com um plasmídeo Ti ou Ri. O uso dessas linhagens para transformação de planta foi relatado, e os métodos são familiares àqueles de habilidade na técnica.

[0063] Tecido de planta a ser transformado é tipicamente inocula-

do e co-culturado com *Agrobacterium* ou *Rhizobium* contendo uma construção recombinante compreendendo pelo menos uma sequência de overdrive ou TSS heteróloga, uma sequência de interesse a ser transferida, e pelo menos uma sequência de RB que serve para definir o DNA a ser transferido, e é selecionado sob condições apropriadas. Em certas modalidades, pelo menos uma sequência de LB está também presente na construção recombinante. Em certas outras modalidades, uma sequência de borda pode ser uma "sequência(s) do tipo borda derivada de planta". Métodos de identificação e uso de tais sequências são descritos em Rommens e outros, 2005; Rommens 2004a; Rommens e outros, 2004b.

[0064] A presente invenção pode ser usada com qualquer célula ou tecido transformável. Aqueles de habilidade na técnica vão reconhecer que tecido de planta transformável geralmente refere-se a tecido que pode ter DNA exógeno inserido em seu genoma e sob condições de cultura apropriadas pode formar em uma planta diferente. Tal tecido pode incluir, mas não é limitado a, suspensões de célula, tecido de calo, tecido hipocotiledônico, cotilédons, embriões, tecido meristemático, raízes e folhas. Por exemplo, tecidos transformáveis podem incluir calos ou embrióides de anteras, microesporos, inflorescences e tecidos de planta. Outros tecidos são também previstos ter utilidade na prática da presente invenção, e o desejo por um explante particular para uma espécie de planta particular é ou conhecido na técnica ou pode ser determinado através de avaliação de rotina e experimentos de teste com o que vários explantes são usados no processo de transformação e aqueles que são mais bem-sucedidos na produção de plantas transgênicas são identificados.

[0065] Métodos para transformação de dicotiledôneas através do uso de *Agrobacterium* ou *Rhizobium* e obtenção de plantas transgênicas foram publicados para várias culturas incluindo algodão, soja,

Brassica e amendoim. Transformação bem-sucedida de plantas monocotiledôneas através de métodos baseados em *Agrobacterium* ou *Rhizobium* foi também relatada. Transformação e regeneração de planta foram conseguidas e relatadas pelo menos em aspargos, cevada, milho, aveia, arroz, cana-de-açúcar, relva *tall fescue* e trigo. Técnicas que podem ser particularmente úteis no contexto de transformação de algodão são reveladas nas Patentes U.S. Nos. 5.846.797, 5.159.135, 5.004.863 e 6.624.344. Técnicas para transformação de plantas *Brassica* em particular são reveladas, por exemplo, na Patente U.S. 5.750.871. Técnicas para transformação de soja são reveladas em, por exemplo, Zhang e outros (1999) e Patente U.S. 6.384.301; e técnicas para transformação de milho são reveladas na, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.981.840, Patente U.S. 7.060.876, Patente U.S. 5.591.616, WO95/06772 e Pub. de Patente U.S. 2004/244075.

[0066] Em uma modalidade, após incubação em meio contendo antibióticos para inibir crescimento de *Agrobacterium* ou *Rhizobium* sem agentes seletivos (meio de retardo), os explantes são culturados em meio de crescimento seletivo incluindo, mas não limitado a, um meio de indução de calo contendo um agente seletivo de célula de planta. Agentes seletivos típicos foram descritos e incluem, mas não estão limitados a, antibióticos tal como G418, parmomomicina, canamicina ou outros agentes químicos tal como glifosato, dicamba e glufosinato. As culturas de tecido de planta sobrevivendo no meio de seleção são subsequentemente transferidas para um meio de regeneração adequado para a produção de mudas transformadas. Regeneração pode ser realizada em várias etapas. Aqueles versados na técnica têm ciência de vários tipos de meios e necessidades de transferência que podem ser implementados e otimizados para cada sistema de planta para transformação e regeneração de planta.

[0067] Os transformantes produzidos são subsequentemente ana-

lisados para determinar a presença ou ausência de um ácido nucléico particular de interesse contido no vetor de transformação. Análise molecular pode incluir, mas não está limitada a, análises *Southern blots* ou PCR (reações em cadeia de polimerase). Esses e outros métodos bem conhecidos podem ser realizados para confirmar a estabilidade das plantas transformadas produzidas através dos métodos revelados, bem como o número de cópia de inserções, e a presença de sequências de estrutura principal de vetor flanqueando o T-DNA. Esses métodos são bem conhecidos daqueles versados na técnica e foram relatados (vide, por exemplo, Sambrook e outros, 1989).

[0068] A discussão acima é meramente um esboço amplo de protocolos de transformação e regeneração padrão. Uma pessoa de habilidade comum na técnica sabe que culturas específicas e protocolos específicos podem variar um pouco do esboço amplo. Uma variedade de meios pode ser usada em cada sistema também. Aqueles de habilidade na técnica são familiares com a variedade de meio de cultura de tecido que, quando suplementado apropriadamente, apóia crescimento e desenvolvimento de tecido de planta. Esses meios de cultura de tecido podem ou ser comprados como uma preparação comercial ou preparados adaptados a gosto e modificados por aqueles de habilidade na técnica. Exemplos de tais meios incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos por Murashige e Skoog (1962); Chu e outros (1975); Linsmaier e Skoog (1965); Uchimiya e Murashige (1962); Gamborg e outros (1968); Duncan e outros (1985); McCown e Lloyd (1981); Nitsch e Nitsch (1969); e Schenk e Hildebrandt (1972) ou derivações desses meios suplementados de acordo. Aqueles de habilidade na técnica têm ciência que meios e suplementos de meio tal como nutrientes e reguladores de crescimento para uso em transformação e regeneração são geralmente otimizados para a cultura alvo particular ou variedade de interesse. Reagentes estão comercialmente disponí-

veis e podem ser comprados de vários fornecedores (vide, por exemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

[0069] Sequências de "overdrive" foram identificadas em vários plasmídeos Ti, incluindo pTiA6, pTiAB3 e pTi15955. Outras sequências com similaridade para overdrive ou TSS podem ser identificadas, por exemplo, usando o programa "BestFit", "Gap" ou "FASTA" do *Sequence Analysis Software Package*, Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wis. 53711 ou usando o programa "BLAST" (Altschul e outros, 1990) ou outro pacote de análise de sequência de DNA disponível. Tais sequências quando presentes em multicópia próximo a uma sequência de RB podem ser avaliadas quanto à atividade de aumento de transformação, similarmente às sequências cuja atividade intensificadora é descrita abaixo.

[0070] "Frequência de transformação", conforme aqui usado, refere-se à porcentagem de eventos transgênicos produzidos por explante ou a porcentagem de plantas transgênicas produzidas por explante.

[0071] "Sequência de borda", por exemplo, borda da direita (RB) ou borda da esquerda (LB), refere-se a uma sequência de ácido nucléico diretamente repetida definindo uma extremidade da região de DNA transferido (T-DNA), tipicamente cerca de 24 pb de comprimento. Sequências de borda podem ser de um plasmídeo Ti ou Ri de *Agrobacterium sp.* ou podem ser sequências derivadas de planta que funcionam similarmente.

[0072] "Região de borda de T-DNA" refere-se à sequência de RB ou LB e sequência de flanqueamento associada, tipicamente de cerca de 100 pb de comprimento, e, conforme encontrado na natureza, pode incluir uma sequência intensificadora de transformação.

[0073] "Eficiência de transformação" conforme aqui usado refere-se a qualquer aperfeiçoamento, tal como um aumento em frequência de transformação e eventos de qualidade que impactam a eficiência

geral do processo de transformação através da redução da quantidade de recursos requeridos para selecionar evento para desenvolvimento comercial adicional.

[0074] "Intensificador de transformação" conforme aqui usado refere-se a sequências de overdrive e TSS.

[0075] Uma primeira sequência de ácido nucléico é "operavelmente ligada" com uma segunda sequência de ácido nucléico quando as sequências são dispostas de modo que a primeira sequência de ácido nucléico afeta o funcionamento da segunda sequência de ácido nucléico. De preferência as duas sequências são parte de uma única molécula de ácido nucléico contígua. A sequência intensificadora de overdrive ou TSS pode ser posta imediatamente adjacente à sequência de borda, tal como a sequência de RB. Alternativamente, em certas modalidades a sequência de overdrive ou TSS está localizada cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ou mais nucleotídeos da extremidade da sequência de borda, incluindo todas as faixas intermediárias. A sequência de overdrive pode ser substituída em qualquer orientação com relação à borda.

EXEMPLOS

[0076] Aqueles de habilidade na técnica vão compreender as muitas vantagens dos métodos e composições providos aqui pela presente invenção. Os exemplos que seguem são incluídos para demonstrar as modalidades preferidas da invenção. Deve ser compreendido por aqueles de habilidade na técnica que as técnicas reveladas nos exemplos que seguem representam técnicas constatadas pelos inventores funcionar bem na prática da invenção, e então podem ser consideradas constituir modos preferidos para sua prática. No entanto, aqueles de habilidade na técnica devem, à luz da presente revelação, compreender que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que são reveladas e ainda obter um resultar igual ou similar

sem se afastar do espírito e do escopo da invenção. Todas as referências citadas aqui são incorporadas aqui a título de referência até o ponto que elas suplementem, expliquem, provejam um *background* para ou ensinem metodologia, técnicas ou composições empregadas aqui.

EXEMPLO 1

[0077] Síntese de sequências intensificadoras de transformação

1) Síntese de sequência de overdrive 4x

[0078] Para sintetizar uma sequência de overdrive de 30 pb 4x (OD)

(5' caaacaaacatacacagcgacttattcacacaacaaaacatacacagcgacttattcacacaaaacatacacagcgacttattcacacaacaaaacatacacagcgacttattcaca 3'; SEQ ID NO:18), par de *primer* de overdrive de 30 pb 2x 5' caaacaaa-catacacagcgacttattcacacaacaaaacatacacagcgacttattcaca 3' (Xd463; SEQ ID NO:1) e 5' tgtgaataagtcgctgttatgtttgttgtgaataagtcgctgttatgttttttg 3' (Xd464; SEQ ID NO:2) foram sintetizados, misturados e amplificados através de PCR por 20 ciclos na presença de polimerase PfuTurbo® de alta fidelidade da Stratagene (La Jolla, CA). O produto de PCR foi fracionado em um gel de Agarose a 1%, e a porção do gel correspondendo ao tamanho variando entre 100-300 pb foi excisada, purificada e ligada em vetor de PCR embotado TOPO Zero da Invitrogen (Carlsbad, CA). O empilhamento de repetição foi confirmado através de sequenciamento. Sequência de overdrive de até 6x foi observada seguindo PCR, embora apenas inserto de 30 pb 4x fosse utilizado na clonagem subsequente de uma construção de overdrive multicópia.

2) Síntese de sequência TSS18x

[0079] Pares de *primer* de repetição de TSS de 8 pb 6x:

[0080] 5' ctgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaa 3'(Xd465; SEQ ID NO:3) e 5' ttgcgtcagttcgtcagttcgtcagttcgtcagtt-

cgtcag 3' (Xd466; SEQ ID NO:4) foram sintetizados e igualmente misturados e amplificados por 5 ciclos na presença de polimerase Pfu Turbo® da Stratagene (La Jolla, CA). A fatia de gel de tamanho de 100-300 pb foi cortada, purificada e ligada em vetor de PCR embotado TOPO Zero da Invitrogen. Repetição de TSS de até 35x foi confirmada através de sequenciamento, mas apenas repetição de TSS de 18x foi mantida para clonagem adicional. O tamanho da overdrive e TSS era dependente dos ciclos de PCR e da posição de gel excisado.

EXEMPLO 2

[0081] Construção de vetores tendo RB com overdrive, overdrive adicional ou TSS 18x

[0082] Para pôr a overdrive ou TSS em frente a uma RB de 24 pb, um sítio de EcoRI foi introduzido em uma RB nopalina, 11 pb distante a montante da RB (de pMON83900). A overdrive 4x ou TSS 18x foi excisada do vetor de clonagem TOPO correspondente digerido através de *Eco*RI e inserida em pMON83900 aberto por *Eco*RI, resultando em pMON83903 e pMON83909, respectivamente.

[0083] A RB modificada contendo ou overdrive 4x ou a TSS 18x de pMON83903 ou pMON83900 foi digerida com *Hind*III/*Spel* e usada para substituir a RB de overdrive 1x de pMON83902 com fragmento *Hind*III/*Spel* compreendendo as sequências intensificadoras de overdrive 4x ou TSS 18x, resultando em pMON87462 e pMON83864, respectivamente, para transformação de soja. Alternativamente, a RB de pMON80105 foi modificada de modo a compreender a overdrive 4x ou TSS 18x através da inserção do fragmento *Spel/Sal*I de pMON83903 ou pMON83909 para dar pMON87465 e pMON87466m respectivamente, de transformação de milho. A RB modificada com sequências intensificadoras de transformação 1x, 4x e 18x é mostrada nas figuras 1 e 4 e SEQ ID NOS.: 14-16.

[0084] Uma construção contendo sequência de overdrive 1x (SEQ

ID NO:17) foi sintetizado primeiro montando o oligonucleotídeo contendo a sequência de overdrive de 30 pb de acordo com protocolo padrão e então clonando-o em pBlueScript®II (Stratagene Inc., La Jolla, CA) resultando em pMON80088. Então fragmento *Spel* e *NotI* (cheios com polimerase) de pMON80088 foi inserido em pMON80105 digerido *Spel* e *SmaI*, resultando em pMON80121 para transformação de milho. Para transformação de soja, construção de RB de overdrive 1x, pMON83902 foi feito substituindo a RB em pMON83898 com o fragmento de RB de overdrive 1x de pMON80121 usando sítios de enzima de restrição *PmeI/NdeI*.

EXEMPLO 3

[0085] Transformação de Milho com sequências de RB intensificadas de Overdrive ou TSS

[0086] Células de milho (*Zea mays*) foram transformadas com vetores pMON80105, pMON80121, pMON87465 ou pMON87466 contendo *oriV* essencialmente conforme descrito na Publ. do Pedido de Patente U.S. 2004/244075 a fim de avaliar a habilidade de empilhamento de sequências intensificadoras de overdrive e TSS adicionais para melhorar a frequência de transformação e a proporção de eventos compreendendo inserção de T-DNA de número de cópia baixo e sem sequência de estrutura principal de vetor (por exemplo, *oriV* derivada de *E. coli*). O tratamento controle consistia em transformação com pMON80105, sem uma sequência de overdrive ou TSS. Conforme mostrado na Tabela 1, uso de construções compreendendo sequências intensificadoras empilhadas resultou em um aumento estatisticamente significante em frequência de transformação. Com esses construções, uma porcentagem maior de FT de qualidade foi também obtida. FT de qualidade combina FT e eventos com uma ou duas cópias. Também, a porcentagem de eventos tendo uma ou duas cópias aumentou.

Tabela 1: Efeito de sequências intensificadoras de transformação sobre frequência de transformação e qualidade de evento em milho

Overdrive em RB	Construção (pMON)	% de Frequência de Transformação (FT) ^a	% de FT de qualidade	% de um ou dois eventos de cópia sem importar a estrutura principal
OD 4X	87465	25,3	12,7%	50,1
OD1 X	80121	24,1	10,4%	43,2
TSS 18X	87466	22,8	10,2%	44,7
Controle	80105	17,7	6,4%	39,0

^a estipula significância estatística

EXEMPLO 4

[0087] Transformação de Soja com Sequências RB Intensificadas de Overdrive ou TSS

[0088] Células de soja (*Glycine max*) foram transformadas com vetores pMON83898, pMON83902, pMON87462 ou pMON87464 contendo *oriV* essencialmente conforme descrito na Patente U.S. 6.384.301 a fim de avaliar a habilidade de empilhamento de sequências intensificadoras de overdrive e TSS para melhorar a frequência de transformação e a proporção de eventos compreendendo inserção de T-DNA de número de cópia baixo e sem sequência de estrutura principal de vetor (por exemplo, *oriV* derivada de *E. coli*). As sequências dos intensificadores de overdrive 4x e TSS 18x empilhados são encontradas nas SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:11, respectivamente. O tratamento controle consistia em transformação com pMON83898, sem uma sequência de overdrive ou TSS. Conforme mostrado nas Tabelas 2-3, uso de construções compreendendo sequências intensificadoras de transformação empilhadas resultou em um aumento na frequência de transformação. A proporção de eventos de cópia única e livres de estrutura principal também aumentou (Tabela 3; coluna 5). Também, a porcentagem de eventos tendo uma ou duas cópias aumentou.

Tabela 2: Efeito de sequências intensificadoras de transformação sobre frequência de transformação em soja

Sequência intensificadora	Plasmídeo pMON	Frequência de transformação (%)
Controle	83898	2,79
Overdrive 1X	83902	3,06
Overdrive 4X	87462	4,22*
TSS 18X	87464	4,10*

*Crescimento significante da estatística

Tabela 3: Efeito de sequências intensificadoras de transformação sobre transformação sobre qualidade do evento

Plasmídeo pMON	Eventos totais	positivo para <i>oriV</i> /positivo da GOI total	negativo para <i>oriV</i> /positivo para GOI total	1 cópia/negativa para <i>oriV</i>	1 ou 2 cópias sem importar a presença ou ausência de <i>oriV</i>
83898 (controle)	31	6/24 (25%)	18/24 (75%)	1 (4%)	19 (79%)
83902 (1X OD)	61	16/45 (35,5%)	29/45 (64,5%)	6 (13,3%)	30 (66,7%)
87462 (4X OD)	43	12/33 (36,4%)	21/33 (63,6%)	4 (12,1%)	23 (69,7%)
87464 (18X TSS)	71	10/50 (20%)	40/50 (80%)	17 (34%)	37 (74%)

EXEMPLO 5

- [0090] Sequências Intensificadoras de Transformação Adicionais
- [0091] Em adição à sequência de overdrive de pTiA6 usada acima (SEQ ID NO:17), outras sequências de overdrive (incluindo as sequências complementares reversas) são conhecidas na técnica (por exemplo, Shurvinton e Ream, 1991) e podem ser usadas similarmente. Essas sequências podem incluir, mas não estão limitadas a, aquelas de pTiAB3 (GenBank M63056) (TGTGAATAATCGCTGTGTATG-

TTTGTTTG; SEQ ID NO:8) e pTi15955 (GenBank AF242881) (TTG-TCTAAATTCTGTATTTGTTGTTTG; SEQ ID NO:9) e a sequência consenso AAACAAACATACACAGCGACTTATTACA (SEQ ID NO:13) e TAARTYNCTGTRNTGTTGTTG; (SEQ ID NO:19, Toro e outros, 1988) dentre outras. *Primers* podem ser sintetizados consequentemente e PCR realizada conforme descrito no Exemplo 1 para criar segmentos de CDA compreendendo essas sequências para uso em construção de plasmídeos recombinantes análogos a pMON83902, pMON80121, pMON87462 e pMON87465, dentre outros. Plantas de cultura podem ser transformadas com construções compreendendo uma ou mais dessas sequências intensificadoras de transformação e podem ser avaliadas quanto à sua habilidade em melhorar a frequência de transformação e a proporção de eventos compreendendo inserção de T-DNA de número de cópia baixo e sem sequência de estrutura principal de vetor.

[0092] Todas as composições e métodos revelados e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem experimentação indevida à luz da presente revelação. Embora as composições e métodos da presente invenção tenham sido descritos em termos das modalidades ilustrativas acima, será aparente àqueles de habilidade na técnica que variações, mudanças, modificações e alterações podem ser aplicadas à composição, métodos e nas etapas ou na sequência de etapas dos métodos descritos aqui, sem se afastar dos verdadeiros conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que certos agentes que são ambos quimicamente e fisiologicamente relacionados podem substituir os agentes descritos aqui enquanto os mesmos resultados ou similares sendo obtidos. Todos tais substitutos e modificações similares aparentes àqueles versados na técnica são considerados estar dentro do espírito, escopo e conceito da invenção conforme definido pelas reivindicações apensas.

REFERÊNCIAS

[0093] As referências que seguem, até o ponto que elas provêem detalhes de procedimento ou outros exemplares àqueles mostrados aqui, são especificamente aqui incorporadas a título de referência.

Patente U.S. 5,004,863, Patente U.S. 5,094,945; Patente U.S. 5,107,065; Patente U.S. 5,159,135; Patent U.S. 5.273.894; Patent U.S. 5.276.268; US Patent 5.561.236; Patente U.S. 5.569.834; Patente U.S. 5.591.616; Patente U.S. 5.627.061; Patente U.S. 5.633.435; Patent U.S. 5.637.489; Patent U.S. 5.646.024; Patente U.S. 5.750.871; Patente U.S. 5.846.797; Patente U.S. 5.981.840; Patente U.S. 6.040.497; Patente U.S. 6.506.559; Patente U.S. 6.624.344; Patent U.S. 6.384.301; Patente U.S. 7.022.896; Patente U.S. 7.060.876.

Patente U.S. Ser. 09/084.942; Patente U.S. Ser. 09/127.735; Patente U.S. Ser. 09/423.143

Pub. de Patente U.S. 2002/0168707 A1; Pub. de Patente U.S. 2003/0188345; Pub. de Patente U.S. 2004/0140376; Pub. de Patente U.S. 2004/244075; Pub. de Patente U.S. 2006/0041956

Altschul e outros. *J. Mol. Biol.*. 215:403-410. 1990.

Barker e outros. *Plant Mol. Biol.*. 2:335-350. 1983.

Bird e outros. *Biotech Gen. Engin. Rev.*. 9: 207-227. 1991.

Canaday e outros. *Mol. Gen. Genet.*. 235:292-303. 1992.

Chu e outros. *Scientia Sinica* 18:659. 1975.

Close e outros. *J. Bacteriol.*. 169(11):5113-5118. 1987.

Culianez-Macia and Hepburn. *Pl. Mol. Biol.*. 11:389-399. 1988.

Dekeyser e outros. *Pl. Physiol.*. 90:217-223. 1989.

Della-Cioppa e outros. *Bio/Technology*. 5 579-584. 1987.

Depicker e outros. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573. 1982.

Duncan e outros. *Planta*. 165:322-332. 1985.

Gamborg e outros. *Exp. Cell Res.*. 50:151. 1968.

Gelvin. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*. 67:16-37. 2003.

- Gibson and Shillitoe. *Mol. Biotech.*... 7:125-137. 1997.
- Hansen e outros. *Plant Mol. Biol.*.. 20(1):113-122. 1992.
- Jen and Chilton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(11):3895-3899. 1986.
- Joersbo e outros. *Mol. Breed.*.. 4:111-117. 1998.
- Kononov e outros. *Plant J.* 11:945-957. 1997.
- Linsmaier and Skoog. *Physiol. Plant.*.. 18 100. 1965.
- McCown and Lloyd. *HortScience.* 16:453. 1981.
- Miki and McHugh. *J. Biotechnol.*.. 107:193. 2004.
- Murashige and Skoog. *Physiol. Plant.* 15: 473-497. 1962.
- Nitsch and Nitsch. *Science.* 163:85-87.1969.
- Pedido PCT WO 01/44482; Pedido PCT WO 02/00900 ; Pedido PCT WO 04/074443; Pedido PCT. WO 04/009761; Pedido PCT. WO 05/121346; Pedido PCT. WO 05/107437; Pedido PCT. WO 95/06722; Pedido PCT. WO 97/48814; Pedido PCT. WO 98/53083; Pedido PCT. WO 99/53050; Pedido PCT. WO 99/61631
- Peralta e outros. *EMBO J.* 5(6):1137-1142. 1986.).
- Rommens e outros. *Plant Physiol.*.. 139:1338-49. 2005.
- Rommens. *Trends Plant Sci.*.. 9:457-64. 2004a.
- Rommens e outros. *Plant Physiol.*.. 135:421-31. 2004b.
- Sambrook e outros. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.. 1989.
- Schenk and Hildebrandt. *Can. J. Bot.*.. 50: 199-204. 1972.
- Shaw e outros. *Nucleic Acids Res.*.. 12(15):6031-6041. 1984.
- Shurvinton and Ream. *J Bacteriol.*.. 173(17):5558-5563. 1991.
- Slighton e outros. *EMBO J.*.. 4(12):3069-3077. 1985.
- Toro e outros. *J. Bacteriol.*.. 171(12):6845-6859. 1989.
- Toro e outros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8558-8562. 1988.
- Uchimiya and Murashige. *Plant Physiol.* 15:73. 1962.
- Van Haaren e outros. *Nucleic Acids Res.*.. 15(21):8983-8997. 1987a.

- Van Haaren e outros. *Plant Mol. Biol.*. 11:773-781. 1988.
- Van Haaren e outros. *Plant Mol. Biol.*. 8:95-104. 1987b.
- Wang e outros. *Cell.* 38:455-462 1984.
- Zhang e outros. *Plant Cell. Tissue. and Organ Culture* 56:37-46. 1999.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de aumento da eficiência de transformação de planta mediada por bactéria, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) introdução de uma ou mais sequências estimuladoras de transferência de T-DNA (“TSS”) intensificadoras de transformação adicionais compreendendo SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:10 em um vetor de transformação de planta compreendendo uma ou mais regiões de borda de T-DNA incluindo uma sequência intensificadora de transformação; e

b) transformação de uma célula de planta com o dito vetor através de transformação mediada por bactéria, em que a bactéria é competente para a transformação da dita célula de planta.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência intensificadora de transformação está localizada próxima a uma sequência de borda da direita (RB) do T-DNA.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a sequência intensificadora de transformação é de um plasmídeo Ri de *A. rhizogenes*.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a transformação mediada por bactéria é transformação mediada por *Agrobacterium*.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a transformação mediada por bactéria é transformação mediada por *Rhizobia*.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a transformação mediada por *Rhizobia* é transformação mediada por *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Bradyrhizobium*.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula de planta é de uma planta selecionada do grupo consistindo em soja, milho, algodão, canola, arroz, trigo, alfafa, feijão comum, amendoim, tabaco, girassol, cevada, beterraba, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, repolho Chinês, pepino, berinjela, alho-poró, alface, melão, aveia, cebola, ervilha, pimenta, amendoim, batata, abóbora, rabanete, sorgo, espinafre, abóbora de inverno, beterraba, tomate e melancia.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula de planta é uma célula de milho ou soja.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região da borda do T-DNA compreende de a partir de 1 a cerca de 18 cópias da dita sequência intensificadora de transformação.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de:

a) regeneração de uma planta transgênica a partir da dita célula de planta.

11. Construção de DNA recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de borda de T-DNA, operavelmente ligada a uma sequência intensificadora de transformação que compreende duas ou mais cópias de uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO:6, uma sequência complementar a SEQ ID NO:6, e combinações das mesmas.

12. Construção de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a sequência intensificadora compreende pelo menos cerca de quatro cópias da dita sequência.

13. Construção de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a sequência de borda é uma sequência de borda da direita (RB).

14. Construção de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a sequência de borda é uma sequência de borda da esquerda (LB).

15. Construção de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a construção compreende SEQ ID NO:11.

16. Construção de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que está inserida no genoma de uma planta, célula de planta ou semente.

17. Construção de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a planta, célula de planta ou semente é de uma planta selecionada do grupo consistindo em soja, milho, algodão, canola, arroz, trigo, alfafa, feijão comum, amendoim, tabaco, girassol, cevada, beterraba, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, repolho Chinês, pepino, berinjela, alho-poró, alface, melão, aveia, cebola, ervilha, pimenta, amendoim, batata, abóbora, rabanete, sorgo, espinafre, abóbora de inverno, beterraba, tomate e melancia.

18. Célula bacteriana transgênica, caracterizada pelo fato de que é transformada com a construção como definido na reivindicação 11.

19. Célula de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que é uma célula de *Agrobacterium*.

20. Célula de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que é uma célula de *Rhizobium*

.

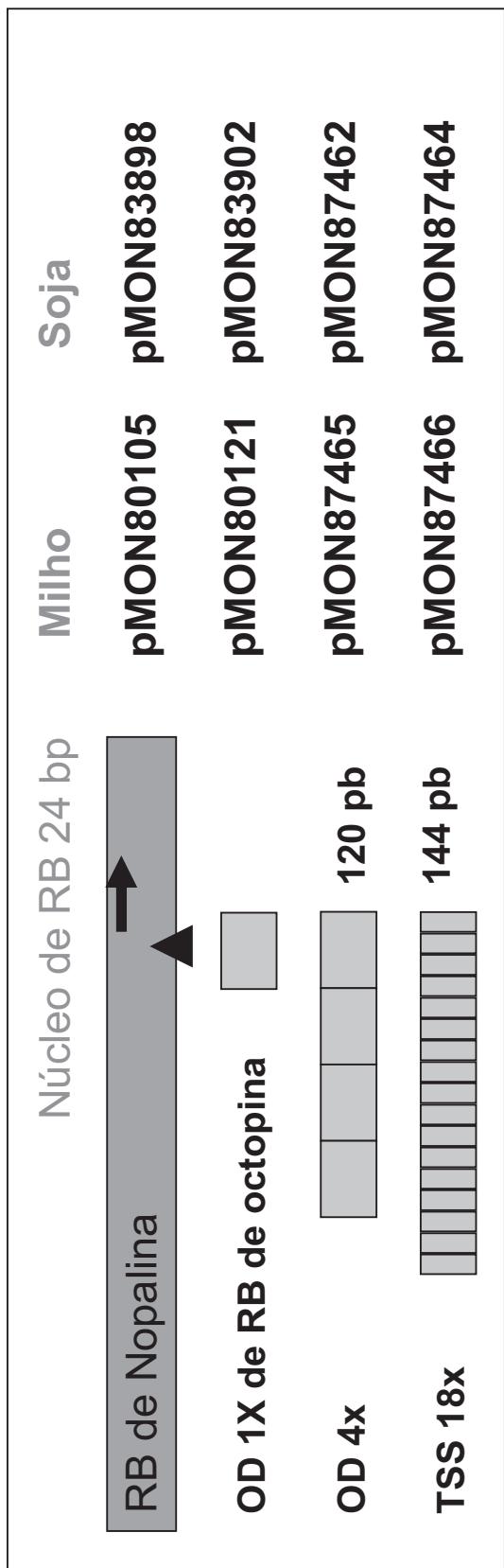
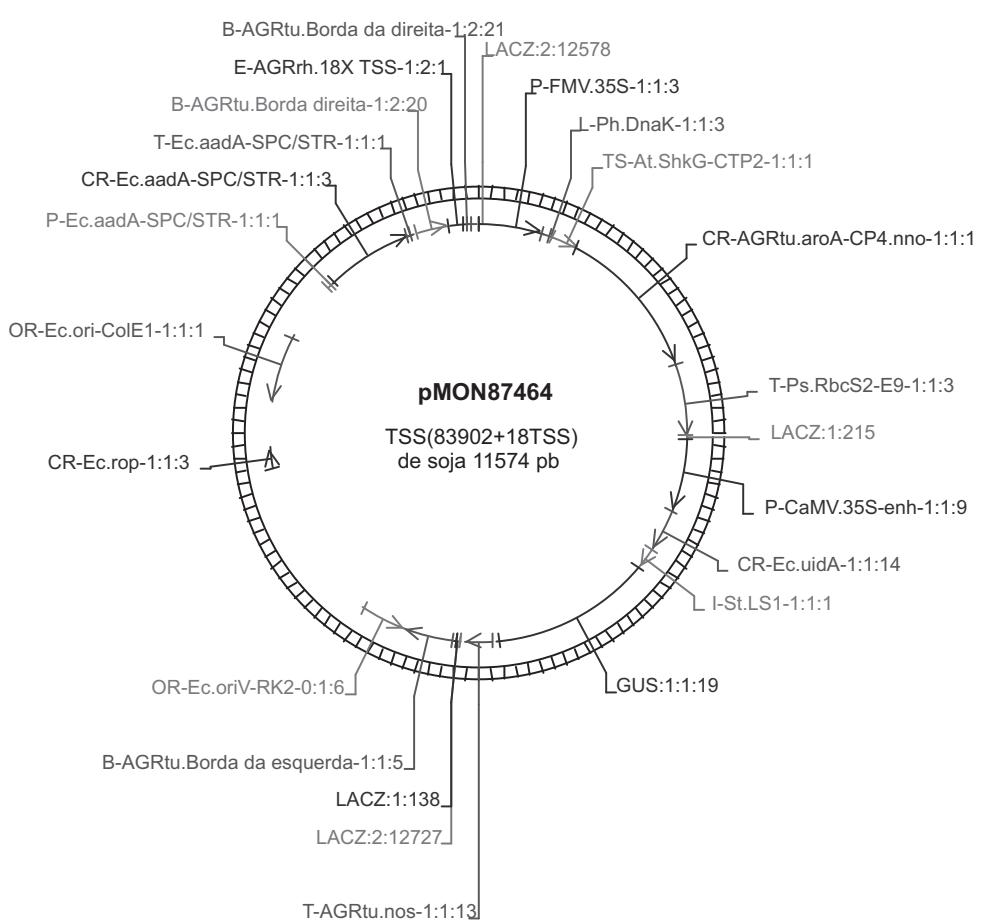
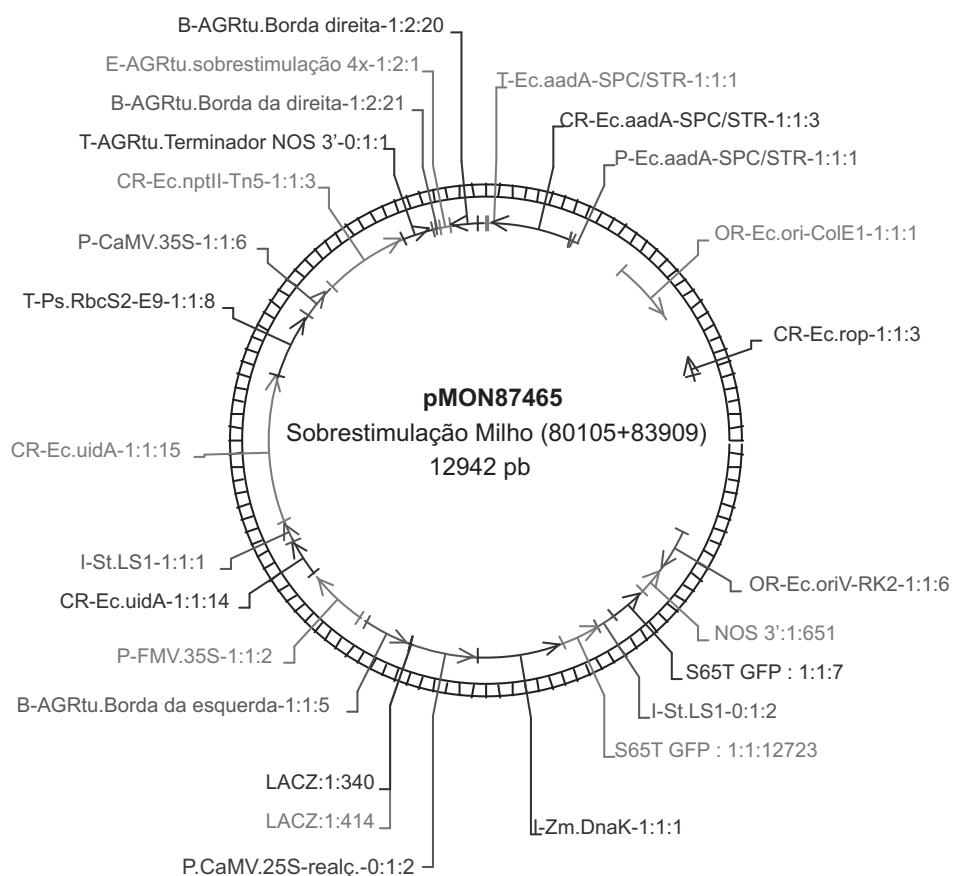


FIG. 1

**FIG. 2**

**FIG. 3**

(A) RB de Nopalina+Sobrestimulação 1x

AGGATTTCGGCGCTGCGTACGTCCGCgACCGCGTTGAGGGATCAA
 GCCACAGCAGCCCCTCGACCTCTAGCCGACCCAGACGAGCCAAGGGATCTT
 TTTGGAATGCTGCTCCGTCGTCAAGGCTTCCGACGTTGGTGGTTAACAGAA
 GTCATTATCGCACGGATGCCAAGCACTCCGAGGGGAACCCCTGTGGTTGGCA
 TGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTCACGCCCTTAAATATCCGA
TTATTCTAATAAACGCTCTTcaaacaacatacacagcgacttattcacaTCTCTTAGGTT
ACCCGCCAATATATCCTGTCA AACACTGATAGTTAAACTGAAGGCGGGAAACG
 ACAATCT

(B) RB de Nopalina+Sobrestimulação 4x

AGGATTTCGGCGCTGCGTACGTCCGCgACCGCGTTGAGGGATCAAG
 CCACAGCAGCCCCTCGACCTCTAGCCGACCCAGACGAGCCAAGGGATCTTT
 TGGAAATGCTGCTCCGTCGTCAAGGCTTCCGACGTTGGTGGTTAACAGAAAG
 TCATTATCGCACGGATGCCAAGCACTCCGAGGGGAACCCCTGTGGTTGGCAT
 GCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTCACGCCCTTAAATATCCGaT
TATTCTAATAAACGCTCTTGAATTGCCCTTcaaacaacatacacagcgacttattcaca
caaacaacatacacagcgacttattcacacaaacacatacacagcgacttattcacacaaacaaacat
acacagcgacttattcacaAAGGGCGAATTCTCTTAGGTTACCCGCCAATATATCCTG
TCAAACACTGATAGTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT

(C) RB de Nopalina+TSS 18x

AGGATTTCGGCGCTACGTCCGCgACCGCGTTGAGGGATCAAGCC
 ACAGCAGCCCCTCGACCTCTAGCCGACCCAGACGAGCCAAGGGATCTTTTG
 GAATGCTGCTCCGTCGTCAAGGCTTCCGACGTTGGTGGTTAACAGAAAGTC
 ATTATCGCACGGATGCCAAGCACTCCGAGGGGAACCCCTGTGGTTGGCATGC
 ACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTCACGCCCTTAAATATCCGaTTA
TTCTAATAAACGCTCTTGAATTGCCCTTctgacgaactgacgaactgacgaactgacgaa
ctgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaa
gacactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaaGGGCGAATTCTCTTAGGTT
ACCCGCCAATATATCCTGTCA AACACTGATAGTTAAACTGAAGGCGGGAAACG
 ACAATCT

FIG. 4