

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 84.888

NOME: CIBA-GEIGY AG., suíça, industrial, com sede em Klybeck
strasse 141, 4002 Basel, Suíça

EPIGRAFE: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PLANTAS TOLERANTES A
HERBICIDAS CONTENDO O GENE DA GLUTATIONA S-TRANS
FERASE

INVENTORES: Georgia Helmer
Steven Rothstein
Mary-Dell Chilton
Chen-Pei David Tu
Liliana Scarafia
Hui-Chen Jean Lai

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

Estados Unidos da América do Norte, sob o Nº 864,467 em
19 de maio de 1986 e o Nº 912,755 em 26 de Setembro de 1986

94-18



MEMÓRIA DESCRITIVA

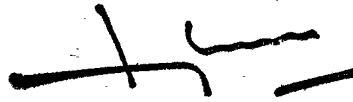
Resumo

Este invento está relacionado com a utilização da tecnologia de DNA recombinante para a transformação de plantas de modo a conferir tolerância a herbicidas

=====

CIBA-GEIGY AG

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PLANTAS TOLERANTES A HERBICIDAS
CONTENDO O GENE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE"



- 2 -

às plantas. Mais especificamente, o invento diz respeito à construção e utilização de uma molécula de DNA recombinante que inclui um gene de glutathione S-transferase (GST) que quando expresso numa planta aumenta os níveis da actividade enzimática GST na planta.

Este invento está relacionado com a utilização de tecnologia de DNA recombinante para a transformação, de plantas para conferir tolerância a herbicidas em plantas, por destoxificação do herbicídio. Mais especificamente, o invento diz respeito à construção e utilização de uma molécula de DNA recombinante que inclua um gene da glutathione S-transferase (GST) que quando da expressão numa planta aumente os níveis de actividade enzimática GST na planta.

As glutathione S-transferases (EC 2.5.1.18) são uma classe de enzimas envolvidos na destoxificação de xenobióticos. Estas enzimas são ubíquas para a maior parte dos organismos vivos, incluindo microorganismos, plantas, insectos e animais. Cada enzima glutathione S-transferase (GST) dentro desta classe é distinta; no entanto, as enzimas apresentam alguma especificidade de substrato sobreponível. Jacoby et al., "Rat Glutathione S-transferases: Binding and Physical Properties", em Glutathione: Metabolism Function, editado por I. Arias e W. Jakoby (Raven Press, New York, 1976); Reddy et al., "Purification and Characterization of Individual Glutathione S-transferase from Sheep Liver", Archives of Biochem. and Biophys., 224 :87-101 (1983).

De entre as múltiplas funções da GST, a catálise por GST da conjugação da glutathione com compostos electrofílicos é de particular interesse. H. Rennenberg, "Glutathione Metabolism and Possible Biological Roles in Higher Plants", Phytochemistry, 21: 2771-2781 (1982); Meister and Tate, "Glutathione and Related Gamma-Glutamyl Compounds: Biosynthesis and Utilization" em Ann. Rev. Biochem. 45: 560-604 (1976). Muitos xenobióticos incluindo herbicidas, pesticidas e insecticidas são compostos electrofílicos. Na conjugação da glutathione com o centro electrofílico do composto, o grupo sulfidrilo da glutathione reage com o centro

electrofílico do composto. A glutathione participa como um nucleófilo por conjugação com o composto electrofílico. Esta conjugação é catalizada por uma enzima GST específica. (Reunenberg, supra).

Nas plantas, esta reacção é importante uma vez que proporciona um mecanismo para a destoxificação do composto xenobiótico. O composto xenobiótico electrofílico conjugado é tornado solúvel em água e não tóxico para a planta.

Seria portanto desejável criar plantas que tolerantes a herbicidas através do aumento dos níveis da actividade enzimática da glutathione S-transferase nas referidas plantas usando técnicas de engenharia genética. Deste modo seria possível conferir tolerância a herbicidas a uma planta.

Este invento é dirigido a moléculas de DNA recombinante que confere tolerância a herbicidas a uma planta através da produção de proteínas que desintoxicam herbicidas. Os mecanismos de destoxificação conhecidos incluem a conjugação de glutathione com um composto electrofílico catalizada pela glutathione S-transferase; conjugação de D-aminoácidos com o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é hidroxilação e conjugação com hidratos de carbono de sulfonureia. Mais particularmente, este invento é dirigido a plantas tolerantes a herbicidas transformadas com uma molécula de DNA recombinante codificadora de uma enzima que destoxifica herbicidas. Especificamente, este invento está ainda relacionado com as moléculas de DNA recombinante compreendendo sequências genéticas codificadoras do pólíptido glutathione S-transferase e com células vegetais transgénicas tolerantes a herbicidas com níveis aumentados de actividade enzimática glutathione S-transferase. Neste invento a célula vegetal é

transformada por um gene de glutathione S-transferase (GST) que quando da expressão ou sobre-expressão, confere tolerância o herbicidas.

Este invento também está relacionado com plantas regeneradas a partir de células vegetais transformadas e suas sementes assim como progênie de plantas regeneradas a partir de células vegetais transgênicas incluindo progênie variante e mutante.

O invento também está relacionado com construções genéticas quiméricas contendo o gene da glutathione S-transferase, vetores de clonagem e hospedeiros e métodos para conferir tolerância a herbicidas em plantas.

Segue-se a descrição breve dos desenhos:

FIGURA 1: Mostra a estratégia de sequenciação da inserção de cDNA em pGTR200 do Y_p 200 um gene da glutathione S-transferase de fígado de rato.

FIGURA 2: Descreve o plasmídeo pCIB710, um replicação de E.coli o qual inclui o promotor do produto de transcrição do DNA 35S de CaMV e o seu terminador e sinal de adição de polia.

FIGURA 3: Mostra a construção do plasmídeo pCIB12, um replicação de E.coli contendo o gene quimérico com o promotor de 35S de CaMV ligado ao cDNA do gene da glutathione S-transferase de fígado de rato, Y_p 200, e o terminador de CaMV.

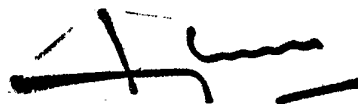
FIGURA 4A: Mostra a construção do plasmídeo pCIB14 um replicação de uma larga gama de hospedeiros, contendo dois genes quiméricos dentro de uma delimitação de T-DNA, com o gene quimérico com o promotor 35S de CaMV ligado ao gene da glutathione S-transferase de fígado de rato, Y_p 200, o terminador de CaMV e o gene de resistência à canamicina, nos-neo-nos.

FIGURA 4B: Mostra a obtenção de um clone parcial pelo método de recombinação in vivo.

FIGURA 4C: Mostra a obtenção de um clone parcial pelo método de ligação in vitro.

FIGURA 5: Mostra os padrões de indução de fluorescência típicos de folhas de tabaco não transgênicas. A curva superior é observada após as folhas, terem embebido atrazina 10^{-5} M durante 48 horas. A curva inferior observa-se após inibição apenas com solução tampão.

FIGURA 6: Mostra os padrões de indução de fluorescência observada em folhas de plantas de tabaco transgênicas com pCIB14 após embebição em 10^{-5} M atrazina durante 48 horas. Observaram-se três classes de respostas: (i) sem destocificação da atrazina, curva do topo; (ii) destoxificação significativa da atrazina, curva do fundo; e (iii) alguma destoxificação intermédia, curva do meio.



- 7 -

FIGURA 7a: Mostra a construção de pCIB5,

FIGURA 7b: Mostra a construção de pCIB4,

FIGURA 7c; Mostra a construção de pCIB2,

FIGURA 7d/e: Descreve a construção de pCIB10,

FIGURA 7f/g: Descreve a construção de pCIB10a.

Na descrição detalhada que se segue foram utilizados uma série de termos usados na tecnologia de DNA recombinante e genética de plantas. Para proporcionar uma compreensão clara e consistente da especificação e reivindicações incluindo o âmbito em que são usados tais termos, são fornecidos as definições que se seguem:

Gene ou DNA heterólogo: Uma sequência de DNA codificadora de um produto, produtos ou funções biológicas específicas que é obtido a partir de uma espécie diferente da espécie em que o gene é introduzido, também designa do um gene ou DNA estranho.

Gene ou DNA homólogo: Uma sequência de DNA codificadora de um produto, produtos ou funções biológicas específicas que foi obtido a partir da mesma espécie em que o gene é introduzido.

Promotor vegetal: Uma sequência de DNA de controle da expressão que é capaz de induzir a transcrição numa planta de qualquer sequência genética de DNA homólogo ou heterólogo operacionalmente ligada a tal promotor.

Promotor vegetal de sobreprodução (OPP^m)

Um promotor vegetal capaz de induzir a expressão numa célula vegetal transgênica de qualquer sequência ou sequências genéticas funcionais ligadas operacionalmente para níveis (medidos pelas quantidades de mRNA ou polipeptídeo) que sejam substancialmente superiores aos níveis naturalmente observados em células hospedeiras não transformadas com o referido OPP.

Glutathione S-transferase: A definição desta enzima é funcional e inclui qualquer glutathione S-transferase (GST) capaz de funcionar numa determinada planta pretendida de modo a catalizar a conjugação da glutathione e de um composto electrofílico. O termo, inclui portanto não apenas a enzima da espécie vegetal específica envolvida na transformação genética mas também pode incluir GST de outra espécie vegetal ou células microbionas ou de mamífero, se tal GST for capaz de funcionar nas células vegetais transgênicas. O termo GST inclui sequências de aminoácidos maiores ou menores do que as GSTs naturais, como sejam fragmentos funcionais ou parciais de GSTs, ou seus análogos.

Planta: Qualquer membro fotossintético do reino Planta que seja caracterizado por um núcleo envolvido por uma membrana, material genético organizado em cromossomas, organelos cito plasmáticos envolvidos por uma membrana e a capacidade de sofrer meiose.

Célula vegetal: A unidade estrutural e fisiológica das plantas, consistindo num protoplasto e numa parede celular.

Tecido vegetal: Um grupo de células vegetais organizadas numa unidade estrutural e funcional.

Orgão vegetal: Uma parte distinta e visivelmente diferenciada de uma planta como seja raiz, caule, folha ou embrião.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

PLANTAS TOLERANTES A HERBICIDAS COM NÍVEIS AUMENTADOS DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA GST

Este invento é dirigido a moléculas de DNA recombinante que conferem tolerância a herbicidas a uma planta por dos herbicidas. Os mecanismos de conhecidos incluem hidroxilação e conjugação com hidratos de carbono da sulfonilureia [Hutchison, et al., Pesticide Biochem. and Physiol., 22: 243-249 (1984)], conjugação, de D-aminoácidos para 2,4-D [Davidonis, et al., Plant Phys., 70: 357-360 (1982)] e a conjugação da glutathione com um composto electrofílico catalizada pela glutathione S-transferase.

Mais particularmente, este invento é dirigido a plantas tolerantes a herbicidas transformadas com uma molécula de DNA recombinante codificadora de uma enzima que destoxifica herbicidas. Especificamente, este invento está ainda relacionado com moléculas de DNA recombinante compreendendo uma sequência genética codificadora de um polipeptídeo glutathione S-transferase e com células vegetais e plantas transgénicas tolerantes a herbicidas com níveis aumenta-

dos da actividade enzimática glutational S-transferase. As células vegetais e plantas contendo glutational foram transformadas por um gene da glutational S-transferase (GST) que, quando expresso na referida célula vegetal e planta aumenta o nível de actividade enzimática GST e portanto confere tolerância a herbicidas à planta. Este invento usa técnicas de engenharia genética na modificação destas plantas.

O termo "planta tolerante a herbicidas" conforme aqui e usado é definido como uma planta que sobrevive e de preferência cresce normalmente numa dose normalmente eficaz de um herbicida. A tolerância a herbicidas em plantas de acordo com o presente invento refere-se a mecanismos de destoxificação numa planta, se bem que o sítio de ligação do herbicida ao sítio alvo seja ainda sensível. A resistência é a tolerância máxima que pode ser conseguida.

A destoxificação deve ser distinguida de um outro mecanismo para conferir tolerância a herbicidas em que o sítio de ligação do herbicida ou sítio alvo é alterado de modo a não ser mais sensível. No presente invento, o sítio de ligação ao herbicida mantém-se sensível mas a herbicida nunca se liga a ele porque o herbicida é destoxificado por exemplo pelo enzima GST. Assim, o termo "tolerância a herbicida" como aqui é usado pretende incluir tolerância e resistência a herbicidas devido à destoxificação do hospedeiro por exemplo através de níveis aumentados de actividade enzimática GST. As plantas tolerantes a herbicidas do presente invento sobrevivem sem problemas na presença de certos herbicidas que não letais ou que danificam o crescimento ou vigor das plantas sensíveis aos herbicidas.

Os herbícidás considerados neste invento incluem todos os que sejam capazes de ser destoxificados por exemplo através da formação de conjugados com glutatona vegetal ou análogos ou homólogos da glutatona, tipicamente um composto electrofilico. São de interesse particular neste invento os herbícidás que tenham resíduos de cloro. Os herbícidás que são considerados neste invento incluem, mas não estão limitados a tiazinas, incluindo clorotriazinas, acetamidas incluindo cloroacetanilidas, sulfonilureia, imidazolinonas, tiocarbonatos, nitrobenzenos clorados, éteres difenílicos e similares. Alguns exemplos específicos de herbícidás incluem atrazina, alaclor, S-etil-dipropiltiocarbomato e difeniletilos. Ver também, Herbicide Resistance in Plants (H. Lebaron e J. Gressel, editores, 1982).

Alguns dos herbícidás são tipicamente inibidores potentes da fotossíntese. Frear et al., Photochemistry, 9: 2123-2132 (1970) (clorotriazinas); Frear et al., Pesticide Biochem. and Physiol., 20: 299-310 (1983) (difeníléter); Lay et al., Pesticide Biochem. and Physiol., 6: 442-456 (1976) (tiocarbamatos); e Frear et al., Pesticide Biochem and Physiol., 23: 56-65 (1985) (metribuzina). Outros desactivam enzimas necessárias à biossíntese de aminoácidos.

Apesar do termo "herbícidás" ser usado para descrever estes compostos a utilização deste termo aqui não pretende ser limitativa. Por exemplo muitos insecticidas e pesticidas (para controle de doenças, parasitas e predadores) que são aplicados às plantas podem ter efeitos nefastos no vigor da planta. O agente insecticida ou pesticida pode ser absorvido pelos tecidos vegetais quer através das folhas e caules quer a partir do solo através do sistema radicular da planta. Ainda, existem muitos xenobióticos que são compostos electrofilicos capazes de serem conjugados com a glutatio-

na numa reacção que é catalizada pela actividade enzimática GST. Estes compostos xenobióticos estão dentro do âmbito deste invento.

Numa execução deste invento, os herbí-
cidas considerados são sensibilizadores ou seja, inibidores da actividade enzimática GST. Estes sensibilizadores inibem o mecanismo de destoxificação endógeno através da formação de um conjugado GST-sensibilizador. A aplicação de um herbí-
cida e de um sensibilizador por exemplo, tridifano, a uma planta inibirá a conjugação enzimática da glutathione e de um herbí-
cida. Ezra et al., "Tridiphane as a Synergist for Her-
bicides in Corn (Zea Mays) e Proso Millet (Panicum miliaceum)
Weed Science, 33: 287-290 (1985).

Assim neste invento as técnicas de en-
genharia genética usadas para conferir actividade enzimática GST ou níveis aumentados de actividade enzimática GST, a uma planta resulta numa planta transgénica mais tolerante ou re-
sistente a sensibilizadores tais como o tridifano. Deste mo-
do, por exemplo, um sensibilizador e um herbí-
cida em combina-
ção podem ser aplicados a plantas sensíveis a herbí-
cidas e simultaneamente a plantas tolerantes a herbí-
cidas de acordo com este invento. A combinação de sensibilizadores e herbí-
cida será tipicamente tóxica para as plantas sensíveis ao herbí-
cida mas não para as plantas transgénicas tolerantes.

Qualquer planta que contenha glutathione ou análogos como seja homoglutathione e que seja capaz de so-
frer manipulação genética por técnicas de engenharia genética pode ser usada neste invento. A planta transgénica deverá também ser capaz de expressar o gene GST. Como aqui é usado o termo "planta" inclui células vegetais, protoplastos vege-
tais, culturas de tecidos vegetais que possam ser cultivados e induzidos a formarem plantas, calos vegetais, massas ce-

lulares e células vegetais que permaneçam intactos em plantas ou partes de plantas. "Planta" também se refere a pólen que possa ser transformado por técnicas de engenharia genética.

A glutathione nas plantas encontra-se tipicamente em concentrações elevadas nos compartimentos subcelulares. A concentração mais alta de glutathione está nos plastos vegetais, tipicamente nos cloroplastos, [Rennenberg H., Phytochemistry, 21 : 2771-2781 (1982)]. A glutathione tem uma estrutura de gama-L-glutamil-L-cisteinil-glicina. Uma forma homóloga da glutathione, a homoglutathione, foi identificada nalgumas plantas, com a estrutura gama-L-glutamil-L-cisteinil-beta-alanina. [Carnegie, P., Biochem. J., 89: 459-471 (1963) e Carnegie, P., Biochem. J., 89: 471-478 (1963)]. As plantas contêm quantidades variáveis de glutathione ou de homoglutathione. Por exemplo, vários legumes contêm principalmente homoglutathione, enquanto que outros legumes contêm essencialmente glutathione. Tipicamente, sempre que a homoglutathione ou a glutathione é predominante numa planta apenas se encontram quantidades reduzidas do outro composto. (Rennenberg, supra).

A região codificadora do gene da glutathione S-transferase (GST) que pode ser usada neste invento pode ser homóloga ou heteróloga para a célula vegetal ou planta a ser transformada. É necessário, no entanto, que a sequência genética codificadora de GST seja expressa e produza uma enzima ou polipeptídeo funcional na célula vegetal resultante. Assim, o invento compreende plantas que contêm genes de GST homólogos ou heterólogos que expressam a enzima GST. Ainda, a GST heteróloga pode ser de outra espécie vegetal ou de organismos pertencentes a outros reinos, como sejam micróbios ou mamíferos.

Conforme anteriormente descrito as enzimas GST são uma classe de enzimas que são multifuncionais. Assim, é também necessário escolher um gene GST que catalize a conjugação de glutathione com um composto electrofilico. Uma vez que GST reconhece a glutathione como substrato, antes deste invento, não era considerado como certo que a enzima GST específica da conjugação com glutathione aceitasse a homogluthione nas plantas transformadas. Frear et al., Phytochemistry, 9: 2123-2132 (1970) (indicando que a glutathione S-transferase era específica da glutathione reduzida). A enzima GST necessária específica da glutathione pode ser identificada e escolhida usando um ensaio que determine a especificidade do substrato para diferenciar as várias glutathione S-transferase. Num ensaio típico a GST específico de glutathione pode ser caracterizada por cromatografia de afinidade. [Tu et al., Biochem and Biophys. Research Comm., 108:1461-467(1982); Tu et al., J. Biol. Chem., 258: 4659-4662 (1983); e Jakoby et al., em Glutathione; Metabolism and Function, (Raven Press, New York, 1976) 7.

Numa execução deste invento, a GST compreende uma GST vegetal que é homóloga da planta a ser transformada. Numa outra execução deste invento, a GST compreende uma GST vegetal que é heteróloga para a planta a ser transformada. Plantas que contêm GST em abundância incluem o milho e o sorgo. Ainda numa outra execução deste invento, a GST compreende uma GST de mamífero. As GSTs de mamífero são conhecidas e estão descritas em Reddy et al., Archives of Biochem, 224: 87-101 (1983) (fígado de carneiro); Tu et al J. Biol. Chem., 258: 4659-4662 (1983) (tecido de rato incluindo coração, rim, fígado, pulmão, baço e testículos). O gene de GST preferido compreende a região codificadora de um gene GST de fígado de rato e especialmente Y_b 200 descrito no Exemplo IA e Y_b 187 completo conforme descrito no Exemplo

IB. Uma outra execução do presente invento compreende a região codificadora de uma GST de cérebro de rato e especialmente o clone de cDNA Gly_p conforme descrito no Exemplo IE. No entanto são conhecidos outros genes GST e podem ser usados neste invento. Ver, Mannervik, B., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 67: 357-417, (1985) aqui incluído como referência.

A sequência de DNA codificadora da glutathione S-transferase pode ser totalmente construída com DNA genômico ou totalmente com cDNA. Como alternativa a sequência de DNA pode ser uma construção híbrida de cDNA e de DNA genômico, em qualquer um dos casos o cDNA pode ser derivado do mesmo gene do DNA genômico ou o cDNA e o DNA genômico podem ser derivados de genes diferentes. Em ambos os casos o DNA genômico e/ou o DNA separadamente podem ser construídos a partir do mesmo gene ou a partir de genes diferentes. Se a sequência de DNA compreender porções de mais de um gene, as porções dos genes podem vir todos do mesmo organismo; de organismos de mais de uma estirpe, variedade ou espécie do mesmo gênero; ou de organismos de mais de um gênero do mesmo ou de diferente reinos.

Porções das sequências de DNA podem ser ligadas umas às outras para formar toda a sequência codificadora da glutathione S-transferase por métodos que são conhecidos na especialidade. Alguns métodos adequados incluem, por exemplo, recombinação de sequência de DNA in vivo, tendo regiões de homologia, ligação in vitro de fragmentos de restrição apropriados.

Existe uma variedade de realizações englobadas pelo conceito lato do invento. Numa das suas execuções este invento compreende sequências genéticas quiméricas contendo:

(a) uma primeira sequência genética codificadora do polipeptídeo glutatona S-transferase que quando da expressão do gene numa determinada célula vegetal, é funcional para a actividade de glutatona S-transferase; e

(b) uma ou mais sequências genéticas adicionais operacionalmente ligadas de ambos os lados de região codificadora de GST. Estas sequências genéticas adicionais contêm regiões de promotor e/ou terminador. As sequências reguladoras vegetais podem ser heterólogas ou homólogas para a célula hospedeira.

Qualquer promotor e qualquer terminador capazes de induzir a expressão de uma região codificadora de GST podem ser usados na sequência genética quimérica. Alguns exemplos adequados de promotores e terminadores incluem os dos genes da nopalina sintetase (nos), octopina sintetase (ocs) e vírus do mosaico de couve-flor (CaMV).

Um tipo de promotor vegetal eficaz que pode ser usado é um promotor vegetal de sobre-produção. Tais promotores, em ligação operacional com a sequência genética codificadora de GST, devem ser capazes de promover a expressão da referida GST de modo, a que a planta transformada seja tolerante a um herbicida devido à presença da actividade enzimática GST ou aos seus níveis aumentados. Os promotores vegetais de sobreprodução que podem ser usados neste invento incluem o promotor da subunidade pequena (ss) da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase de soja [Berry-Lowe et al., J. Molecular and Appl. Gen., 1: 483-498 (1982)] e o promotor da proteína de ligação à clorofila a/b. Estes dois promotores sabe-se serem induzidos pela luz em células vegetais eucarióticas [ver, por exemplo Genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective, A. Cashmore, Plenum, New York

1983, páginas 29-38, Coruzzi G. et al., The Journal of Biological Chemistry, 258: 1399 (1983), e Dunsmuir, P. et al., Journal of Molecular and Applied Genetics, e:285(1983).

A sequência genética quimérica compreendendo o gene da glutathione S-transferase operacionalmente ligado a um promotor vegetal pode ser ligado a um vector de clonagem adequado. Em geral, são usados vectores do tipo plasmídeo ou viral (bacteriólogo) contendo sequências de replicação e controle derivados de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector de clonagem será, tipicamente, portador de uma origem de replicação assim como de genes específicos que sejam capazes de proporcionar marcas de selecção fenotípica nas células hospedeiras transformadas, tipicamente resistência a antibióticos ou resistência a herbicidas seleccionados. Os vectores transformantes podem ser seleccionados através destas marcas fenotípicas após transformação de uma célula hospedeira.

As células hospedeiras que podem ser usadas neste invento incluem procariotas incluindo hospedeiros bacterianos tais como A. tumefaciens, E. Coli, S. typhimurium, Serratia marcescens e cianobactérias. Também podem ser usadas neste invento células hospedeiras eucarióticas como sejam leveduras, fungos filamentosos e células vegetais.

O vector de clonagem e a célula hospedeira transformada com o vector são usados neste invento tipicamente para aumentar o número de cópias do vector. Com um número de cópias aumentado os vectores contendo o gene GST podem ser isolados e, por exemplo usados para introduzir as sequências genéticas quiméricas nas células vegetais.

A introdução de DNA nas células hospedeiras pode ser conseguida por métodos conhecidos na especialidade. As células hospedeiras bacterianas podem ser transformadas, por exemplo, após tratamento das células com cloreto de cálcio.

O DNA pode ser inserido nas células vegetais por contacto directo dos protoplastos das células com o DNA. Como alternativa, o DNA pode ser inserido nas células vegetais através do contacto das células com vírus ou com Agrobacterium. O contacto com vírus e Agrobacterium pode ocorrer quando da infecção de células vegetais sensíveis ou através da cocultura de protoplastos de células vegetais com Agrobacterium. Estes métodos são discutidos mais detalhadamente abaixo.

Existe uma série de métodos para a inserção directa de DNA em células vegetais. Por exemplo, o material genético contido no vector pode ser microinjectado directamente nas células vegetais usando micropipetas para transferir mecânicamente o DNA recombinante. O material genético pode também ser transferido para protoplastos vegetais após tratamento dos protoplastos com polietilenoglicol [Paskowski et al., EMBO J., 3: 2717-22 (1984)].

Numa execução alternativa deste invento, o gene GST pode ser introduzido nas células vegetais por electroporação [Shillito et al., Biotechnology, 3: 1099-1103 (1985); Fromm et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82: 5824 (1985)]. Nesta técnica os protoplastos vegetais são electroporados na presença de plasmídeos contendo a construção genética GST. Impulsos eléctricos de alta voltagem tornam permeáveis as biomembranas de um modo reversível, permitindo a introdução dos plasmídeos. Os protoplastos vegetais electroporados, refazem as paredes celulares, dividam-se e

formam calos vegetais. A selecção das células vegetais transgênicas com a enzima GST expressa pode ser conseguida usando marcas fenótípicas conforme descrito atrás.

O vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) pode também ser usado como vector para a introdução do gene GST nas células vegetais deste invento (Hohn et al., em "Molecular Biology of Plant Tumors", Academic Press, New York, 1982 páginas 549-560; Howell, Patente dos Estados Unidos Nº 4 407 956). Todo o genoma de DNA viral do CaMV é inserido num plasmídeo bacteriano parenteral criando uma molécula de DNA recombinante que pode ser propagada em bactérias. O plasmídeo recombinante é clivado com enzimas de restrição ao acaso ou em sítios únicos não vitais na porção viral do plasmídeo recombinante, por exemplo, no gene para a transmissão por afídeos, para inserção da sequência genética GST. Um pequeno oligonucleotídeo descrito como um adaptador, tendo um sítio de restrição único pode também ser inserido. O plasmídeo recombinante modificado pode de novo ser clonado e ainda modificado por introdução da sua sequência genética GST num sítio de restrição único. A porção viral modificada do plasmídeo recombinante é então removida do plasmídeo bacteriano parenteral e usada para inocular células vegetais ou plantas.

Um outro método para o introduzir do gene GST nas células é infectar uma célula vegetal com Agrobacterium tumefaciens transformada com o gene GST. Nas condições adequadas conhecidas na especialidade as células vegetais transgênicas são crescidas para formar rebentos e raízes e para se desenvolverem posteriormente em plantas. As sequências genéticas GST podem ser introduzidas em células vegetais adequadas, por exemplo, por meio do plasmídeo Ti de Agrobacterium tumefaciens. [De Cleene et al., Bot. Rev., 47: 147-194 (1981); Bot. Rev. 42: 389-466 (1976)]. O plasmídeo Ti é transmitido às células vegetais quando da infecção

por Agrobacterium tumefaciens e é estávelmente integrado no genoma vegetal. [Horsch et al., Science, 233:496-498 (1984); Fraley et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 80: 4803 (1983)]7.

Para as plantas cujas células não são sensíveis à infecção por Agrobacterium pode-se recorrer à co-cultura de Agrobacterium com os correspondentes protoplastos.

Os plasmídeos Ti contêm duas regiões essenciais para a produção de células transformadas. Uma destas a região de DNA de transferência, (T-DNA) é transferida para plantas e induz a formação de tumores. A outra a região virulenta (vir) é essencial para a formação mas não para a manutenção de tumores. A região de DNA de transferência pode ser aumentada no tamanho pela inserção da sequência genética GST sem que a sua capacidade de transferência seja afectada. Através da remoção de genes causadores de tumores de modo a que as células vegetais transgênicas não sejam tumorais, e adição de uma marca seleccionável, o plasmídeo Ti modificado pode ser usado como vector para a transferência das construções genéticas do invento para células vegetais adequadas.

A região vir faz com que a região de T-DNA a ser transferido de Agrobacterium para o genoma de uma célula vegetal ocorra independentemente da região de T-DNA e da região vir estarem no mesmo vector ou em vectores diferentes na célula de Agrobacterium. Uma região vir num cromossoma também induz a transferência de T-DNA de um vector para uma célula vegetal.

O sistema preferido para a transferência de uma região de T-DNA de Agrobacterium para células vegetais compreende uma região vir num vector que não seja o vector que contem a região de T-DNA. Tal sistema é conhecido como um sistema binário de vectores e o vector contendo o T-DNA é conhecido como um vector binário.

Qualquer vector contendo T-DNA que possa ser transferido para células vegetais e que permita às células transformadas serem seleccionadas é adequado para utilização neste invento. É preferido um vector construido a partir de um promotor, uma sequência codificadora e pCIB10.

Qualquer vector contendo a região vir que provoque a transferência de uma região de T-DNA de Agrobacterium para células vegetais pode ser usado neste invento. O vector contendo a região vir preferido é o pCIB542.

As células vegetais ou plantas transformadas com DNA de acordo com este invento podem ser seleccionadas através de uma marca fenotipica adequada que esteja presente no DNA além do gene GST. Estas marcas fenotipicas incluem, mas não estão limitadas a marcas de resistência a antibióticos, como sejam os genes de canamicina e higromicina, ou marcas de resistência a herbicidas. Na especialidade são conhecidas outras marcas fenotipicas e podem ser usadas neste invento.

Todas as plantas cujas células possam ser transformadas por inserção directa do DNA ou por contacto com Agrobacterium e regeneradas em plantas completas podem ser sujeitas aos métodos deste invento de modo a produzir plantas completas transgénicas que contêm o gene GST transferido. Há um aumento crescente de evidência de que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou

tecidos em cultura, incluindo mas não estando limitado a todas as espécies principais de cereais, cana do açúcar, beterraba açucareira, algodoeira, árvores de fruto e outras, legumes e vegetais.

Em adição incluído no âmbito do presente invento as culturas alvo são, por exemplo, as do grupo constituído por Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Litrus, Linum, Geranium, Mamihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapsis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Antirrhinum, Hesperis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Panicum, Senecio, Salpiglossis, Lucumis, Browallia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum e Sorghum assim como as do grupo consistindo em Ipomoea, Passiflora, Cyclamen, Malus, Prunus, Rosa, Rubus, Populus, Santalum, Allium, Lilium, Narcissus, Ananas, Arachis, Phaseolus e Pisum.

Presentemente existe um conhecimento limitado sobre se todas estas plantas podem ser transformadas por Agrobacterium. Mesmo espécies que não sejam hospedeiras vegetais naturais para Agrobacterium podem ser transformáveis in vitro. Por exemplo, plantas monocotiledóneas e, em particular, cereais e ervas não são hospedeiros naturais de Agrobacterium. Existe agora uma evidência crescente de que certas monocotiledóneas podem ser transformadas por Agrobacterium. Usando novas abordagens experimentais que se tornaram agora disponíveis espécies de cereais e de ervas podem ser transformáveis [Grimoley, N. et al., Nature, 325:177-179 (1987)].

A regeneração de plantas a partir do protoplastos em cultura está descrita em Evans et al., "Protoplast Isolation and Culture" em Handbook of Plant Cell Culture, 1: 124-176 (MacMillan Publishing Co. New York 1983); M.R. Bavery; "Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplast", Protoplasts, em 1983-Lecture Proceedings, pág. 19-29, (Birkhauser, Basel 1983); P.J.Dale, "Protoplast Culture" and Plant Regeneration of Cereals And other Recalcitrant Crops", em Protoplasts 1983-Lecture Proceedings, pág 31-41, (Birkhauser, Basel 1983); e H. Binding, "Regeneration of Plants", em Plant Protoplasts, pág. 21-37, (CRC Press, Boca Raton 1985).

A regeneração varia de espécie vegetal para espécie vegetal, mas geralmente obtém-se primeiro uma suspensão de protoplastos, células ou tecidos transformados contendo múltiplas cópias do gene GST.

A formação de embriões pode então ser induzida a partir de suspensões e deixada decorrer até uma fase de maturação e germinação como embriões naturais. De um modo geral os meios de cultura conterão vários aminoácidos e hormonas, como sejam auxina e citocininas. É também vantajoso adicionar ácido glutâmico e prolina ao meio, especialmente para espécies tais como milho e alfafa. Rebentos e raízes normalmente desenvolvem-se em simultâneo. Uma regeneração eficaz dependerá do meio, do genótipo e da história da cultura. Se estas três variáveis forem controladas então a regeneração é totalmente reprodutível e repetível.

Algumas plantas adequadas ao uso neste invento incluem, por exemplo, espécies dos géneros Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, litrus, Linum, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapsis, Atropa, Capsium, Datura, Hyoscyamus, Lycopersi

con, Nicotiana, Solanum, Petunia, Majorana, Lichorum,
Helianthus, Lactuca, Asparagus, Antirrhinum, Panicum,
Pennisetum, Ranunculus, Salpiglossis, Glycine, Gossypium,
Malus, Prunus, Rosa, Populus, Allium, Lilium, Narcissus
Ananas, Arachis, Phaseolus e Pisum.

Uma vez que se encontre Oryza (arroz) pode ser regenerada para plantas completas a partir de protoplastos deverá ser possível regenerar outras plantas pertencentes à família das Graminae. Portanto as plantas que se seguem podem ser usadas no presente invento; holium, Zea, Tritium, Sorghum e Bromus.

As plantas preferidas de acordo com este invento são dos géneros Nicotiana spp, (e.g. tabaco), Glycine spp. (especialmente Glycine max. soja) e Gossypium spp. (algodoeiro).

As plantas maduras crescidas a partir das células vegetais transformadas são auto-fecundadas para produzir sementes, algumas das quais contem o gene para níveis aumentados de actividade enzimática GST em proporções que seguem as leis da hereditariedade bem estabelecidas. Estas sementes podem ser cultivadas para produzir plantas que sejam tolerantes a herbícidas. A tolerância destas sementes pode ser determinada, por exemplo, por crescimento das sementes em solo contendo um herbicida. Como alternativa a tolerância a herbícidas das plantas transforma das pode ser determinada pela aplicação de um herbicida à planta.



Linhas homozigóticas podem ser produzidas por auto-fecundação repetida para dar plantas tolerantes a herbícidas. Estas plantas podem ser usadas para desenvolver híbridos tolerantes a herbícidas. Neste método uma linha resultante de auto-fecundação tolerante a herbícidas é cruzada com uma outra resultante auto-fecundação para produzir um híbrido resistente a herbícidas.

Partes obtidas a partir da planta regenerada, como sejam flores, sementes, folhas, ramos, frutos e similares estão cobertas pelo invento desde que estas partes compreendam as células tolerantes a herbícidas. A pro-gênie (incluindo progênie híbrida), variantes e mutantes das plantas regeneradas podem também ser incluídos no âmbito deste invento.

UTILIZAÇÕES PARA AS CONSTRUÇÕES GENÉTICAS GST E PLANTAS TOLERANTES A HERBÍCIDAS

As construções genéticas GST, conforme atrás descrito, podem ser usadas em vectores como intermediários na preparação de células vegetais, órgãos vegetais, tecidos vegetais e plantas tolerantes a herbícidas.

A importância de plantas tolerantes a herbícidas de acordo com o invento é óbvia. Tais plantas permitirão aos agricultores plantar uma seara tolerante a herbícidas e depois tratar o campo contra ervas daninhas sem afectar adversamente a colheita. Ainda, uma planta tolerante aos herbícidas permitirá aos agricultores cultivar campos que tenham sido tratados com herbícidas, por exemplo, durante um ciclo de rotação de culturas em que uma planta naturalmente tolerante é alternada com uma planta naturalmente sensível.

Estes campos tratados com herbícidas podem conter uma certa quantidade de "persistência de herbícida" no solo. As culturas rotativas que sejam naturalmente sensíveis ao herbícida podem ser prejudicadas pela tal "persistência de herbícida" a menos que se tornem tolerantes [Sheets, T. Residue Reviews, 32:287-310 (1970); Burnside, et al., Weed Science, 19: 290-293 (1971)].

Por exemplo os agricultores tipicamente plantam culturas de milho e soja em sucessão alternada. Se bem que a cultura de milho possa naturalmente ser tolerante a certos herbícidas, por exemplo determinados herbícidas do tipo triazina como seja a atrazina, a cultura de soja mais sensível, plantada após os campos de milho terem sido tratados com herbícidas pode ser danificada. Pela utilização de uma planta tolerante a herbícidas de acordo com este invento é evitada a danificação devida a persistência de herbícida [Fink, et al., Weed Science, 17: 35-36 (1969) (sojas); Keham, et al., Weed Research, 21: 9-12 (1981) (aveia e trevo); Brinkman, et al., Crop Science, 20:185-189(aveia); Eckurt, et al., J. Range Mgmt., 25: 219-224 (1972) (grama)].

O invento também inclui um método para controle de plantas que se caracteriza pelo contacto de uma população mista consistindo numa planta sensível a herbícidas, como seja uma erva daninha e uma planta tolerante a herbícidas do invento com quantidades de um herbícida controladoras de plantas, as quais são suficientes para controlar as plantas sensíveis aos herbícidas. Assim, o tratamento foliar da planta com herbícidas num campo com plantas tolerantes a herbícidas e com ervas daninhas sensíveis a herbícidas e em que ambos os tipos de plantas são simultaneamente postos em contacto com o herbícida durante a operação de tratamento é um método incluído no presente invento.

Também, conforme previamente descrito, este invento inclui o método de controle de plantas caracterizado pela aplicação de um herbicida e de um sensibilizador si multaneamente a plantas tolerantes a herbicidas e a plantas sensíveis a herbicidas.

O termo "quantidades do herbicida controladoras de plantas" inclui, funcionalmente, uma quantidade de herbicida que é capaz de afectar o crescimento ou desenvolvimento de uma determinada planta. Assim, a quantidade pode ser suficientemente pequena para simplesmente retardar ou suprimir o crescimento ou desenvolvimento, ou a quantidade pode ser suficientemente para destruir irreversivelmente a planta sensível.

A quantidade de herbicida depende do herbicida e da planta a ser controlada. Por exemplo as plantas dicotiledóneas e ervas daninhas são muitas vezes controladas com concentrações de herbicidas entre 0,5 e 1,5 kg/ha. Para a planta monocotiledóneas são típicas concentrações de herbicidas entre 0,5 kg/ha e cerca de 2,0kg/ha. Alguns herbicidas tais como herbicidas de sulfonilureia sabe-se controlarem plantas com quantidades significativamente mais baixas.

O herbicida pode, certamente, ser posto com a planta adequada usando métodos de pulverização e dispersão bem conhecidos. Por exemplo, a administração foliar usada em trabalhos anteriores para o controle de ervas daninhas através de atrazina pode ser usado com plantas tolerantes à atrazina dentro do âmbito do invento.

Tendo agora descrito de um modo geral este invento, o mesmo será melhor compreendido por referência a exemplos específicos, os quais estão aqui incluídos apenas com fins ilustrativos e não se pretendem com limitantes a mesmo que de outro modo seja especificado.

EXEMPLOS

Os processos dos exemplos que se seguem podem ser de um modo geral encontrados em Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982,. As enzimas a menos que seja especificado podem ser obtidas à New England Biolabs e são usados de acordo com as recomendações do fabricante a menos que de outro modo seja indicado.

EXEMPLO IA

Isolamento do clone de cDNA de GST γ_b

200

ANTICORPOS:

Anti-soro contra glutathione S-transferase hepática de rato homogenea (GSTs) (fracção de cromatografia de afinidade) foram levantados conforme descrito [Tu et al., Nucleic Acids Res., 10: 5407-5419 (1982)]. A fracção IgG foi purificada através de uma coluna de proteína A-Sepharose (Pharmacia) e concentrada por ultrafiltração (Amicon, membrana XM-50) conforme descrito por Kraus e Rosenberg [Kra-

us & Rosenberg, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 79: 4015-4019 (1982) 7. Foi guardada em 50% glicerol e 0,2 mg/ml de heparina a -18°C.

ISOLAMENTO DE POLISSOMAS:

Fígados (ca. 26g) de dois ratos macho Sprague-Dawley (peso ca. 300g) foram homogenizados com um homogenizador Potter-Elvehjem em 150 ml (volume final) de 50mM tris-Mcl, pH 7,5, 25mM MgCl₂, 0,25 M sacarose contendo bentonite (1 mg/ml), heparina (0,2 mg/ml) e ciclo-heximida (1 micrograma/ml) em várias quantidades pequenas para um homogenato a 15% (p/vol.). Os polissomas foram isolados exactamente de acordo com processos publicados, Kraus & Rosenberg, supra. O rendimento é de 1389 unidades A₂₆₀ antes e 1208 unidades A₂₆₀ após diálise.

IMOBILIZAÇÃO DE COMPLEXOS POLISSOMA-ANTICORPO E ELUIÇÃO DO mRNA ESPECÍFICO:

Recuperaram-se 1130 unidades A₂₆₀ de polissomas para imunoabsorção com IgG anti-GST (7,1 mg). A cromatografia de afinidade em proteína A-Sepharose e eluição dos RNAs ligados foram efectuados conforme descrito por Kraus & Rosenberg supra. Os RNAs eluidos são imediatamente ajustados a 0,5 M NaCl e 0,5% dodecilsulfato de sódio e purificados ainda por coluna de oligo (dt)-celulose [Aviv & Leder, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 69: 1408-1414 (1972); Bantle et al Anal. Biochem. 72:413-417 (1976) 7. Os RNAs poli(A+) purificados foram testados por tradução in vitro e imunoprecipitação [Tu et al., Nucleic Acids Res. 10:5407-5419 (1982); Pelham e Jackson, Eur. J. Biochem., 67:247-256 (1976) 7

antes da síntese de cDNA.

Os materiais imunoprecipitados foram separados em géis de doceilsulfato de sódio-poliacrilamida e visualizados após fluorografia [Laemmli, Nature, 227: 680-684 (1970); Swanstrom e Shenk, Anal. Biochem, 86: 184-192 (1978)].

ISOLAMENTO DE CLONES DE cDNA DE GST:

A síntese de cDNA é efectuada de acordo com o método de Okayama e Berg [Okayama e Berg, Mol. Cell Biol., 2:161-170 (1982)] conforme modificado por Gubler e Hoffman, Gene, 25: 263-269(1983)] com pequenas modificações. Aproximadamente 100-500 mg de RNA poli(A+) de polissomas imunoprecipitados foram usados para a síntese de cDNA. A transcrição reversa do mRNA em cDNA é feita em 40 microlitros contendo 50 mM tris-MCl pH 8,3, 100mM NaCl₂, 10mM DTT, 4mM pirofosfato de sódio, 1,25 mM dos quatro dNTPs, 1800 u/ml de RNasina (Promega Biotec), 100 microgramas/ml de oligo-(dt)₁₂₋₁₈ (Pharmacia/PL) e 3000 U/ml de Transcreptase Reversa (Molecular Genetics).

A reacção foi incubada 25 minutos a 43°C, depois terminada pela adição de 2 microlitros de 0,5M EDTA. A reacção foi extraída com 1 volume de fenol: clorofórmio e a fase aquosa extraída de novo com metade do volume de clorofórmio. A fase orgânica foi extraída de novo com tampão TE.

Às fases aquosas combinadas adicionou-se 1 volume de acetato de amónio 4M e o ácido nucleico foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol e arrefecimen-

to em neve carbônica durante 20-30 minutos. A solução foi então aquecida até à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugado durante 15 minutos numa centrífuga Eppendorf a 4°C. O sedimento resultante foi dissolvido em 25 microlitros de tampão TE. Acetato de amônio (25 microlitros de 4M) e 100 microlitros de etanol foram adicionados e o ácido nucleico precipitado e recuperado como anteriormente. O sedimento foi lavado com 70% etanol, seco e dissolvido em 20 microlitros de água.

A substituição da cadeia de mRNA do híbrido mRNA: cDNA foi conseguida em 50 microlitros contendo 20mM tris-HCl pH 7,5, cloreto de magnésio 5mM, sulfato de amônio 10mM, KCl 100mM, beta-NAD 0,15mM, 0,04 mM dos quatro dNTPs, 20 microlitros do produto com a primeira cadeia, 10-20 microlitros de ^{32} P-dATP, 10U/ml de DNA ligase de E. coli (New England Biolabs), 230U/ml de DNA polimerase (Boehringer Manheim) e 8,5 U/ml de RNA se H de E. coli (Pharmacia/PL). A reacção foi incubada 90 minutos a 12-14°C, depois uma hora à temperatura ambiente. O cDNA de cadeia dupla foi purificado por extracção com fenol/clorofórmio e recuperado por precipitação com etanol exactamente como descrito para o produto com a primeira cadeia. O sedimento final seco foi dissolvido em 20 microlitros de água.

Dez microlitros do cDNA de cadeia dupla foram dotados de caudas dCTP num volume de 20 microlitros contendo cacodilato de potássio 100mM pH7,0, 1mM CoCl_2 , 0,2 mM DTT, 0,1 mM dCTP e 500 U/ml de desoxinucleotidilo transferase terminal (Pharmacia/PL). A reacção foi incubada 1-2 minutos a 37°C após o que 20 microlitros de 4mM EDTA foi adicionado e a enzima inactivada pelo calor por incubação a 65°C durante 10 minutos.

pBR322 digerido com pst-I e dotado de caudas dG (Bethesda Research Labs, Inc.) foi adicionado numa proporção molar de aproximadamente 1:1 a cDNA de cadeia dupla com caudas dC (i.e. um excesso de cerca de 5-10 vezes por peso molecular de vector sobre a quantidade calculada de cDNA). A solução de DNA (cDNA + vector) foi diluída para dar uma concentração final de DNA total de 0,5-2,0 mg/microlitro (0,5 é ótimo) na presença de 10mM Tris- HCl 7,5 = pH, 1mM EDTA e 150mM NaCl. A mistura foi incubada durante 5 minutos a 65°C, depois o DNA emparelhado a 55-58°C durante 90 minutos.

O cDNA: vector emparelhado foi usado para transformar E. coli estirpe MM 294 usando 5 microlitros de DNA por 200 microlitros de células competentes para a transformação [Hanahan J. Mol. Biol. 155:557-580 (1983)]; a frequência de transformação controle é de $1-2 \times 10^8$ transformantes por microgramas de DNA de pBR322 circular covalentemente fechado. As células transformadas são semeadas em placas LM (sem magnésio) contendo 17 microgramas/ml de tetraciclina (Hanahan, supra). As células resultantes foram testadas para a sensibilidade à ampicilina. As colônias resistentes à tetraciclina e sensíveis à ampicilina (ca. 50%) foram colhidas para posterior análise.

TRADUÇÃO IN VITRO DE SELECIONADOS POR HIBRIDAÇÃO COM pGTR200

DNAs de plasmídeos foram purificados usando um processo de lise alcalina [Birnboim e Doly, Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523 (1979)] a partir de 354 transformantes sensíveis à ampicilina e estes DNAs digeridos com Pst para determinar os tamanhos das inserções de cDNA. Entre eles, 134 contêm inserção de cDNA visíveis por electro

forese em gel de agarose. Os que possuíam inserções superior a 800 nucleotídeos foram ainda analisados por hibridação de transferência Southern [Southern, J. Mol. Biol., 98: 503-517 (1975)] usando Y_a (pGTR261) e Y_c (pGTR262) como sondas [Lai et al., J. Biol. Chem. 259:5526-5542(1984); Tu et al., J. Biol. Chem., 259: 9434-9439 (1984)].

Doze clones que não hibridaram com estas sondas foram então caracterizados por tradução in vitro de seleccionados por hibridação Cleveland et al., Cell, 20: 95-105 (1980)]. Um destes clones negativos foi designado pGTR200. RNAs poli(A+) de fígado de rato seleccionados através de DNA de pGTR200 imobilizado em celulose ativada com aminofeniltioéter (papel APT) foram eluídos a 75°C e 100°C e usados para programar tradução in vitro no sistema de lisado de reticulócitos de coelho. Os produtos da tradução in vitro foram imunoprecipitados por anti-soros contra GSTs totais de fígado de rato por electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio e pliacrilamida. O produto imunoprecipitado tem a mobilidade de Y_b ; nenhuma outra classe de subunidades GST é seleccionada por pGTR200. Experiências anteriores de tradução in vitro de seleccionados por hibridação com clones de Y_a e Y_c não revelaram quaisquer produtos da subunidade Y_b (Lai et al supra; Tu et al., supra).

SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA INSERÇÃO DE cDNA DO pGTR200

A sequência do cDNA em pGTR200 foi determinada de acordo com a estratégia apresentada na Fig.1 pelo método químico de Maxam e Gilbert [Maxam e Gilbert, Methods Enzymol, 65: 459-560 (1980)]. Os fragmentos de DNA gerados pelas várias clivagens com endonuclease de restrição foram marcados nos extremos 3'. Cada determinação foi repetida pelo menos uma vez.

A sequência de nucleotídeos está apresentada abaixo. O código de aminoácidos com uma única letra foi usado para a grelha de leitura aberta de 218 resíduos. Old e Primrose, Principles of Gene Manipulation, (1985 Blackwell's Publications, London, p. 346. O sinal de adição de poli(A+), AATAAA está sublinhado.

[Handwritten signature]

10 20 30 40 50 60
CTGAAGCCAAATTGAGAAGACCACAGCGCCAGAACCATGCCTATGATACTGGGATACTGG
M P M I L G Y W

70 80 90 100 110 120
AACGTCCGCGGGCTGACACACCCGATCCGCTGCTCCTGGAATACACAGACTCAAGCTAT
N V R G L T H P I R L L L E Y T D S S Y

130 140 150 160 170 180
GAGGAGAAGAGATACGCCATGGGCGACGCTCCCGACTATGACAGAAGCCAGTGGCTGAAT
E E K R Y A M G D A P D Y D R S Q W L N

190 200 210 220 230 240
GAGAAGTTCAAACCTGGGCTGGACTTCCCAATCTGCCCTACTTAATTGATGGATCGCGC
E K F K L G L D F P N L P Y L I D G S R

250 260 270 280 290 300
AAGATTACCCAGAGCAATGCCATAATGCGCTACCTTGCCCGCAAGCACCACCTGTGTGGA
K I T Q S N A I M R Y L A R K H H L C G

310 320 330 340 350 360
GAGACAGAGGAGGAGCGGATTTCGTGCAGACATTGTGAGAACCAGGTCATGGACAACCGC
E T E E E R I R A D I V E N Q V M D N R

370 380 390 400 410 420
ATGCAGCTCATCATGCTTTGTTACAACCCGACTTTGAGAAGCAGAAGCCAGAGTTCTTG
M Q L I M L C Y N P D F E K Q K P E F L

430 440 450 460 470 480
AAGACCATCCCTGAGAAGATGAAGCTCTACTCTGAGTTCCTGGGCAAGCGACCATGGTTT
K T I P E K M K L Y S E F L G K R P W F

490 500 510 520 530 540
GCAGGGGACAAGGTCACCTATGTGGATTTCCTTGCTTATGACATTCTTGACCAGTACCAC
A G D K V T Y V D F L A Y D I L D Q Y H

550 560 570 580 590 600
ATTTTGTAGCCCCAAGTGCCTGGACGCTTCCCAAACCTGAAGGACTTCCTGGCCCCGCTTC
I F E P K C L D A F P N L K D F L A R F

610 620 630 640 650 660
GAGGGCTGAAGAAGATCTCTGCCTACATGAAGAGCAGCCGCTACCTCTCAACACCTATA
E G L K K I S A Y M K S S R Y L S T P I

670 680 690 700 710 720
TTTTCGAAGTTGGCCCAATGGAGTAACAAGTAGGCCCTTGCTACACTGGCACTCACAGAG
F S K L A Q W S N K *

730 740 750 760 770 780
AGGACCTGTCCACATTGGATCCTGCAGGCACCCTGGCCTTCTGCACTGTGGTTCTCTCTC

790 800 810 820 830 840
CTTCCTGTCCCTTCTCCAGCTTTGTGAGCCCATCTCCTCAACCTCACCCAGTCATGC

850 860 870 880 890 900
CCACATAGTCTTCATTCTCCCCACTTTCTTTATAGTGGTCCCCTTCTTTATTGACACCT

910 920 930 940 950 960
TAACACAACCTCACAGTCCTTTTCTGTGATTTGAGGTCTGCCCTGAACTCAGTCTCCCTA

970 980 990 1000 1010 1020
GACTTACCCCAAATGTAACACTGTCTCAGTGCCAGCCTGTTCTGTTGGGGGAGCTGCC

1030 1040 1050 1060 1070
 CAGGCCTGTCTCATCTTTAATAAGCCTGAAACACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

EXEMPLO IB

ISOLAMENTO DO CLONE DE cDNA PARCIAL DE GST, Y_b 187

Essencialmente pelo mesmo processo obteve-se o clone de cDNA Y_b 187. Y_b 187 é um clone cDNA parcial sem 96 nucleotídeos no extremo 5' da sequência codificadora. A sequência de nucleotídeos e a correspondente sequência de aminoácidos para os restantes 96 nucleotídeos e Y_b 187 estão apresentadas abaixo:

1 0	30
ATG CCT ATG ACA CTG GGT TAC TGG GAC ATC CGT GGG CTG GCT CAC	
Met Pro Met Thr Leu Gly Tyr Trp Asp Ile Arg Gly Leu Ala His	
50	7 0
GCC ATT CGC CTG TTC CTG GAG TAT ACA GAC ACA AGC TAT GAG GAC	90
Ala Ile Arg Leu Phe Leu Glu Tyr Thr Asp Thr Ser Tyr Glu Asp	
1 10	13 0
AAG AAG TAC AGC ATG GGG GAT GCT CCC GAC TAT GAC AGA AGC CAG	
Lys Lys Tyr Ser Met Gly Asp Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Ser Gln	
150	1 70
TGG CTG AGT GAG AAG TTC AAA CTG GGC CTG GAC TTC CCC AAT CTG	
Trp Leu Ser Glu Lys Phe Lys Leu Gly Leu Asp Phe Pro Asn Leu	
19 0	210
CCC TAC TTA ATT GAT GGG TCA CAC AAG ATC ACC CAG AGC AAT GCC	
Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ser His Lys Ile Thr Gln Ser Asn Ala	
2 30	25 0
ATC CTG CGC TAC CTT GGC CGG AAG CAC AAC CTT TGT GGG GAG ACA	270
Ile Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Lys His Asn Leu Cys Gly Glu Thr	
2 90	31 0
GAG GAG GAG AGG ATT CGT GTG GAC GTT TTG GAG AAC CAG GCT ATG	
Glu Glu Glu Arg Ile Arg Val Asp Val Leu Glu Asn Gln Ala Met	
330	3 50
GAC ACC CGC CTA CAG TTG GCC ATG GTC TGC TAC AGC CCT GAC TTT	
Asp Thr Arg Leu Gln Leu Ala Met Val Cys Tyr Ser Pro Asp Phe	
37 0	390
GAG AGA AAG AAG CCA GAG TAC TTA GAG GGT CTC CCT GAG AAG ATG	
Glu Arg Lys Lys Pro Glu Tyr Leu Glu Gly Leu Pro Glu Lys Met	



4 10	43 0	450
AAG CTT TAC TCC GAA TTC CTG GGC AAG CAG CCA TGG TTT GCA GGG		
Lys Leu Tyr Ser Glu Phe Leu Gly Lys Gln Pro Trp Phe Ala Gly		
4 70	49 0	
AAC AAG ATT ACG TAT GTG GAT TTT CTT GTT TAC GAT GTC CTT GAT		
Asn Lys Ile Thr Tyr Val Asp Phe Leu Val Tyr Asp Val Leu Asp		
510	5 30	
CAA CAC CGT ATA TTT GAA CCC AAG TGC CTG GAC GCC TTC CCA AAC		
Gln His Arg Ile Phe Glu Pro Lys Cys Leu Asp Ala Phe Pro Asn		
55 0	570	
CTG AAG GAC TTC GTG GCT CGG TTT GAG GGC CTG AAG AAG ATA TCT		
Leu Lys Asp Phe Val Ala Arg Phe Glu Gly Leu Lys Lys Ile Ser		
5 90	61 0	630
GAC TAC ATG AAG AGC GGC CGC TTC CTC TCC AAG CCA ATC TTT GCA		
Asp Tyr Met Lys Ser Gly Arg Phe Leu Ser Lys Pro Ile Phe Ala		
6 50		
AAG ATG GCC TTT TGG AAC CCA AAG TAG		
Lys Met Ala Phe Trp Asn Pro Lys End		

EXEMPLO IC

CLONE COMPLETO CORRESPONDENTE A Y_b 187

Os nucleotídeos em falta foram adicionados a Y_b 187 in vivo por recombinação ou in vitro por ligação dos fragmentos restrição adequados. Estes métodos estão ilustrados nas Figuras 4B e 4C, respectivamente.

A recombinação pode ser efectuada através da introdução em E. coli estirpe SR43 (ATCC número de acesso 67 217 depositada em 22 de Setembro de 1986) do clone de DNA genómico inserido num plasmídeo col E1 (eg pUC8 ou pBR322) e do clone de cDNA inserido num plasmídeo inc P1 (eg pRK290). A estirpe SR34 possui mutações pol A1 sup F183 [Tacon, W. & Sherratt, D., Mol. Gen. Genet., 147: 331-335 (1976)] de modo a que a replicação dos plasmídeos col E1 seja evitada à temperatura restrictiva (42 graus). A transferência de bactérias SR34 contendo os dois plasmídeos da temperatura permissiva (28 graus) para 42 graus com manutenção da selecção por resistência a antibióticos contida no plasmídeo col eL' (eg resistência Ap do pBR322) permite a selecção de bactérias contendo formas cointegradas dos dois plasmídeos. Tais plasmídeos cointegrados são formados por recombinação em regiões de homologia de DNA. O isolamento dos plasmídeos cointegrados permite a clonagem da sequência de cDNA de tamanho completo e da sequência a montante como um único fragmento Pst I ou Bam HI. O corte com Bal 31 do DNA a montante seguido da adição do adaptador Bam HI permite o isolamento de um clone contendo a região codificadora de tamanho completo (confirmado por análise da sequência de DNA).

A região codificadora de tamanho completo foi clonada como um fragmento Bam HI em pCIB710 conforme descrito no Exemplo IA para a transferência para células vegetais. Este mesmo fragmento foi clonado em pDR540 conforme descrito no Exemplo IV abaixo para a expressão em E. coli.

Como alternativa todo o clone correspondente a Y_p 187 pode ser construído por ligação de fragmentos de restrição adequados de clones de cDNA e de DNA genómico em conjunto, (Figura I). Os plasmídeos pUC19 contendo o extremo 5' do clone genómico inserido como um fragmento PstI-Hind III contem aproximadamente as primeiras 400 bases da

sequência codificadora. O extremo 3' da sequência codificadora de cDNA pode ser isolado como um fragmento HinfI de 630 pares de bases a partir do clone de cDNA parcial em BR325. O plasmídeo PUC cortado no seu único sítio HinfI e o fragmento HinfI contendo o extremo 3' do gene foram ligados um ao outro, recreando toda a sequência codificadora do gene GST. O gene GST completo foi isolado como um fragmento BglI-PstI. O corte com Bal 31 do DNA a montante seguido da adição do adaptador Bam HI permite o isolamento da região codificadora de tamanho completo sem sequência a montante. Este fragmento Bam HI foi inserido em pCIB710 e em pDR540 conforme descrito atrás.

EXEMPLO ID

CLONES HÍBRIDOS: Construíram-se clones híbridos derivados das sequências codificadoras dos diferentes genes essencialmente do modo como descrito atrás para a combinação do clone de cDNA parcial Y_p 187 e dos nucleotídeos em falta (Exemplo IC) usando genes heterólogos como fonte dos dois fragmentos de DNA.

EXEMPLO IE

ISOLAMENTO DO CLONE DE cDNA DE GST G1 Y_b

Construiu-se uma biblioteca de cDNA no vector de expressão fágico λ gt 11 [Young, R.A. Davis, R.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 1194 (1983)] a partir de RNA poli(A) isolado a partir de cérebros de rato, segundo os métodos descritos anteriormente (ver Exemplo IA). O cDNA foi isolado por processos de rastreio com anticorpos usando anticorpos induzidos com GST de cérebro de rato. O isolamento de RNA e a construção e isolamento do correspondente cDNA foram conseguidos pelos métodos descritos em trabalhos anteriores, como sejam os de Young e Davis [Young e R.A. e Davis, R.W., Science, 222: 778-782 (1983)].

A sequência de nucleotídeos e a correspondente sequência de aminoácidos do clone de cDNA resultante G1 Y_b estão apresentados abaixo:

- 41 -

	10		30
A	GAC CCC AGC ACC	ATG CCC ATG ACA CTG GGT TAC TGG GAC ATC	
		Met Pro Met Thr Leu Gly Tyr Trp Asp Ile	
	5 0		70
CGT GGG CTA GCG CAT GCC ATC CGC CTG CTC CTG GAA TAC ACA GAC			
Arg Gly Leu Ala His Ala Ile Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Thr Asp			
90		11 0	130
TCG AGC TAT GAG GAG AAG AGA TAC ACC ATG GGA GAC GCT CCC GAC			
Ser Ser Tyr Glu Glu Lys Arg Tyr Thr Met Gly Asp Ala Pro Asp			
	1 50		17 0
TTT GAC AGA AGC CAG TGG CTG AAT GAG AAG TTC AAA CTG GGC CTG			
Phe Asp Arg Ser Gln Trp Leu Asn Glu Lys Phe Lys Leu Gly Leu			
	190		2 10
GAC TTC CCC AAT CTG CCC TAC TTA ATT GAT GGA TCA CAC AAG ATC			
Asp Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ser His Lys Ile			
	23 0		250
ACC CAG AGC AAT GCC ATC CTG CGC TAT CTT GGC CGC AAG CAC AAC			
Thr Gln Ser Asn Ala Ile Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Lys His Asn			
70		29 0	310
CTG TGT GGG GAG ACA GAA GAG GAG AGG ATT CGT GTG GAC ATT CTG			
Leu Cys Gly Glu Thr Glu Glu Glu Arg Ile Arg Val Asp Ile Leu			
	3 30		35 0
GAG AAT CAG CTC ATG GAC AAC CGC ATG GTG CTG GCG AGA CTT TGC			
Glu Asn Gln Leu Met Asp Asn Arg Met Val Leu Ala Arg Leu Cys			

370 3 90
TAT AAC CCT GAC TTT GAG AAG CTG AAG CCA GGG TAC CTG GAG CAA
Tyr Asn Pro Asp Phe Glu Lys Leu Lys Pro Gly Tyr Leu Glu Gln

41 0 430 4
CTG CCT GGA ATG ATG CGG CTT TAC TCC GAG TTC CTG GGC AAG CGG
Leu Pro Gly Met Met Arg Leu Tyr Ser Glu Phe Leu Gly Lys Arg

50 47 0 490
CCA TGG TTT GCA GGG GAC AAG ATC ACC TTT GTG GAT TTC ATT GCT
Pro Trp Phe Ala Gly Asp Lys Ile Thr Phe Val Asp Phe Ile Ala

5 10 53 0
TAC GAT GTT CTT GAG AGG AAC CAA GTG TTT GAG GCC ACG TGC CTG
Tyr Asp Val Leu Glu Arg Asn Gln Val Phe Glu Ala Thr Cys Leu

550 5 70
GAC GCG TTC CCA AAC CTG AAG GAT TTC ATA GCG CGC TTT GAG GGC
Asp Ala Phe Pro Asn Leu Lys Asp Phe Ile Ala Arg Phe Glu Gly

59 0 610 6
CTG AAG AAG ATC TCC GAC TAC ATG AAG TCC AGC CGC TTC CTC CCA
Leu Lys Lys Ile Ser Asp Tyr Met Lys Ser Ser Arg Phe Leu Pro

30 65 0 670
AGA CCT CTG TTC ACA AAG ATG GCT ATT TGG GGC AGC AAG TAG GAC
Arg Pro Leu Phe Thr Lys Met Ala Ile Trp Gly Ser Lys End Asp

6 90 71 0
CCT GAC AGG TGG GCT TTA GGA GAA AGA TAC CAA ATC TCC TGG GTT
Pro Asp Arg Trp Ala Leu Gly Glu Arg Tyr Gln Ile Ser Trp Val

730 7 50
TGC CAA GAG CCC TAA GGA GCG GGC AGG ATT CCT GAG CCC CAG AGC
Cys Gln Glu Pro End Gly Ala Gly Arg Ile Pro Glu Pro Gln Ser

77 0 790 8
CAT GTT TTC TTC CTT CCT TCC ATT CCA GTC CCC AAG CCT TAC CAG
His Val Phe Phe Leu Pro Ser Ile Pro Val Pro Lys Pro Tyr Gln

10 83 0 850
CTC TCA TTT TTT GGT CAT CAA ATT CCT GCC AAA CAC AGG CTC TTA
Leu Ser Phe Phe Gly His Gln Ile Pro Ala Lys His Arg Leu Leu

8 70 89 0
AAA GCC CTA GCA ACT CCT TTC CAT TAG CAA AAT AGC CTT CTA AAG
Lys Ala Leu Ala Thr Pro Phe His End Gln Asn Ser Leu Leu Lys

910 9 30
TTA AAG TGC CCC GCC CCC ACC CCT CGA GCT CAT GTG ATT GGA TAG
Leu Lys Cys Pro Ala Pro Thr Pro Arg Ala His Val Ile Gly End

95 0 970 9
TTG GCT CCC AAC ATG TGA TTA TTT TGG GCA GGT CAG GCT CCC CGG
Leu Ala Pro Asn Met End Leu Phe Trp Ala Gly Gln Ala Pro Arg

90 101 0 1 030
CAG ATG GGG TCT ATC TGG AGA CAG TAG ATT GCT AGC AGC TTT GAC
Gln Met Gly Ser Ile Trp Arg Gln End Ile Ala Ser Ser Phe Asp

10 50 107 0
 CAC CGT AGC CAA GCC CCT CTT CTT GCT GTT TCC CGA GAC TAG CTA
 His Arg Ser Gln Ala Pro Leu Leu Ala Val Ser Arg Asp End Leu
 1 090 11 10
 TGA GCA AGG TGT GCT GTG TCC CCA GCA CTT GTC ACT GCC TCT GTA
 End Ala Arg Cys Ala Val Ser Pro Ala Leu Val Thr Ala Ser Val
 113 0 1 150 11
 ACC CGC TCC TAC CGC TCT TTC TTC CTG CTG TGA GCT GTA CCT
 Thr Arg Ser Tyr Arg Ser Phe Phe Leu Leu Leu End Ala Val Pro
 70 119 0 1 210
 CCT GAC CAC AAA CCA GAA TAA ATC ATT CTC CCC TTA AAA AAA AAA
 Pro Asp His Lys Pro Glu End Ile Ile Leu Pro Leu Lys Lys Lys
 AAA AAA AAA A
 Lys Lys Lys

EXEMPLO II

CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pCIB 710:0 plasmídeo pLW111, ATCC
 N240235, consiste nos três fragmentos mais pequenos Eco RI
 da estirpe BJI do vírus do Mosaico da couve-flor (CaMV) [Fra
 ck et al., Cell, 21: 285-294 (1980)] clonado em pMB9. pLW111
 foi digerido com Bgl II e isolado um fragmento de 1149 pb
 (pares de bases 6494-7643). Este fragmento foi liado ao sítio
 Bam HI de pVC 19. Este fragmento de restrição codifica
 o promotor do RNA 35 de CaMV e o sinal de adição de poli A
 (i.e.o. terminador) para aquele produto de transcrição.

MUTAGÊNESE IN VITRO: Um sítio único Bam HI foi inserido entre este promotor e o terminador via mutagênese in vitro. Sintetizou-se um oligonucleotídeo de 36 bases indêntico à sequência de CaMV naquela região exceptuando um sítio de restrição Bam HI que foi inserido no par de bases II 7464 na sequência.

O fragmento Bgl II de 1149 pb atrás referido foi clonado em M13 mp19 e isolado o DNA fágico de cadeia simples. Este DNA de cadeia simples foi emparelhado com o oligonucleotídeo sintético, sintetizou-se uma nova cadeia usando o oligonucleotídeo como iniciada; e o DNA usado para transfectar E. coli estirpe J M 101 [Zoller & Smith, DNA 3: 479-488 (1980)]. Fagos M13 tendo o sítio Bam HI inserido foram isolados conforme descrito em Zoller & Smith, supra.

SELECÇÃO DO FAGO MUTANTE PRETENDIDO: O oligonucleotídeo de 36 bases foi marcado por fosforilação com ³²P-ATP. Uma série de placas fágicas de M13 transfectadas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose. Este filtro foi hidridado com o 36-mero marcado. O filtro foi lavado a temperaturas crescentes. O 36-mero marcado ligado ao fago mutado é estável à temperatura de lavagem mais alta. Um destes fagos estável à temperatura mais alta foi isolado e sequenciado para confirmar a presença do sítio Bam HI.

CONSTRUÇÃO DE pCIB 710: DNA de cadeia dupla isolado a partir deste fago foi digerido com Hind III e Eco RI. pUC19 foi cortado com HIND III e Eco RI. Estes dois DNAs digeridos foram ligados. Os transformantes foram seleccionados por resistência à ampicilina. Um transformante desta ligação é o pCIB 710. Este plasmídeo está apresentado na Figura 2.

EXEMPLO III

CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pCIB 11, pCIB12, pCIB13 e pCIB14

1.0 plasmídeo pGTR200 foi digerido com Hae II, Pst I e Pvu II e o fragmento Hae II/Pst I e de 678 pb contendo a sequência codificadora de GST foi isolado a partir de um gel de agarose.

2. Este fragmento Hae II/Pst I foi dotado de extremos cegos por tratamento com DNA polimerase de T4 e ligados adaptadores Bam HI (dCGGATCCG-New England Biolabs) aos extremos cegos usando DNA ligase de T4.

3.0 plasmídeo pCIB710 foi cortado com Bam HI e tratado com fosfatase alcalina de intestino de vitela (Boehringer Mannheim).

4.0 fragmento GST provido de adaptadores Bam HI do parágrafo anterior foi ligado a pCIB710 digerido com Bam HI, a mistura de ligação foi usada para transformar E. coli estirpe HBol01 e os transformantes pretendidos seleccionados por resistência à ampicilina. Os transformantes portadores das sequências codificadoras de GST na orientação correcta para a transcrição a partir do promotor de CaMV (pCIB12)

assim como na orientação oposta (pCIB 11) foram caracterizados

5.0 plasmídeo pCIB10 (ver Exemplo IV) foi digerido com xbaI e Eco RI.

6.0 plasmídeo pCIB12 foi digerido com xbaI e Eco RI e o fragmento menor isolado de um gel de agarose.

7.0 fragmento xba I/Eco RI isolado, portador do gene quimérico, foi ligado ao pCIB10 digerido, a mistura de ligação usada para transformar E. coli HB101 e os transformantes seleccionados por resistência à canamicina. Estes transformantes, portadores da sequência codificadora de GST na orientação correcta para a transcrição a partir do promotor CaMV foram designados pCIB14 (ver Figura 3).

8.0 plasmídeo pCIB11 foi idênticamente manipulado para construir pCIB13, um plasmídeo tendo a sequência codificadora de GST na orientação oposta à adequada para a transcrição a partir do promotor de CaMV.

INTRODUÇÃO DE pCIB13 e pCIB14 EM AGROBACTERIUM: Dna de plasmídeo purificado de pCIB13 ou pCIB14 foi introduzido por transformação em Agrobacterium tumefaciens A 136 [Watson et al., J. Bacteriol., 123:255-264 (1975)] possuidora de pCIB542 (ver Exemplo VII abaixo). Os transformantes foram seleccionados em canamicina (50 mg/ml) e espectanomicina (25 µg/ml).

EXEMPLO IV

INSERÇÃO DO GENES GST Y_p 200 NO VECTOR DE EXPRESSÃO trp-lac:

O plasmídeo pCIB12 foi digerido com Bam HI e o fragmento do gene GST com adaptadores Bam HI de 708 pb foi isolado. O plasmídeo pDR540 (Pharmacia P-L Biochemicals) um vector de expressão trp-lac [Russel, D.R. e Bennett, G.N. Gene, 20:231-243 (1982)] foi digerido com Bam HI e o fragmento GST e ele liado. O plasmídeo recombinante resultante foi usado para transformar E. coli, estirpe JM103. As culturas da estirpe resultante foram induzidas na altura pretendida pela adição de 1,0mM isopropil-beta-D-tiogalactosido (IPTG).

Após indução com IPTG e expressão do gene GST Y_p 200 as células bacterianas hospedeiras foram sedimentadas. Os sedimentos formados foram ressuspensos em 59 ml de 0,2M Tris-HCl, pH 8,0 e 1mM EDTA. A esta suspensão adicionou-se 0,5 ml de 100mM fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) em etanol e 5 ml de lisozina a 10 mg/ml em tampão. A suspensão foi incubada durante aproximadamente 15 minutos a 37°C até as células bacterianas estarem lisadas. A suspensão de células bacterianas lisadas foi sedimentada e o sobrenadante colhido. O sobrenadante foi dializado contra 25mM Tris-HCl, pH 8,0 com 1/100 do volume de pMSF.

O sobrenadante dializado foi testado relativamente à actividade enzimática de GST. Após isto, o sobrenadante dializado foi aplicado numa coluna de afinidade de S-hexilglutathiona-agarose a um fluxo de 0,5 ml/minuto. A coluna foi lavada com 25 mM Tris-HCl, 0,2 MKCl até a absorvância a 280nm ser inferior a 0,005. Após todo o material não ligado ter sido lavado da coluna, o material ligado foi e-

luido com 25 mM Tris-HCl, 0,2 M KCl (pH 8,0) contendo 5mM S-hexilglutathiona e 2,5mM glutathiona. As fracções eluidas foram controladas a uma absorvância de 280nm. As fracções que se pensou conterem a enzima purificada foram dializadas individualmente contra 0,1M NaPO₄ (pH 6,5) contendo PEG para concentrar as fracções e depois no mesmo tampão sem PEG.

Os volumes de cada uma das fracções dializadas foram registados. Para cada fracção o grau de concentração e a quantidade de amostra, foi calculado e depois diluido de modo a que estivesse presente em cada fracção a mesma proporção relativa à fracção de partida. Cada fracção foi testada para a actividade enzimática.

A actividade GST foi testada usando como substrato 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (ClDNB). Para cada reacção 1mM ClDNB (20,2 mg/ml em etanol) foi adicionado para 5mM glutathiona reduzida (30,8 mg/ml em tampão, 0,1 fosfato de sódio, pH 6,5) e enzima GST. ClDNB e glutathiona reduzida foram preparados no próprio dia. A reacção tinha um volume total final de 1 ml. A reacção decorreu à temperatura ambiente e foi iniciada pela adição de ClDNB. A reacção foi controlada num espectro fotómetro Gilford a 340nm. Uma reacção típica continha 10 a 50 unidades de GST, em que 1 unidade é equivalente a 1 nanomole de substrato convertido por minuto por ml.

A concentração proteica das fracções enzimaticamente activas foi determinada no material de partida (Bio Rad, padrão BSA). Cada uma das fracções enzimaticamente activas foi analisada num gel Laemmli de 15 por cento usando diluições da enzima padrão (1,0 µg, 0,3 µ e 0,1 µg) como padrão quantitativos. A enzima purificada foi detectada por imunotransferência anticorpos específicos.

EXEMPLO V

CONSTRUÇÃO DE pCIB 10 E pCIB 10a: A construção do plasmídeo pCIB10 e pCIB10a foi descrita no pedido pendente dos mesmos autores, Série Nº 757 098 entregue em 19 de Julho, 1985 intitulada "Transformation of Plastids and Mitochondria" e aqui incluído como referência. Os passos que se seguem descritos e numerados como se segue no pedido de patente atrás referido foram usados para construir estes plasmídeos (ver Figuras 7a e 7g).

CONSTRUÇÃO DE pCIB 10:15. Um fragmento de T-DNA contendo a região delimitante esquerda de pTiT37 foi isolado a partir do pBR325 (Eco RI 29) [Yadav et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 79; 6322 (1982)]. pBR325 (Eco RI29) foi cortado com Eco RI e o fragmento de 1,1 kb dotado de adaptadores Hind III (New England Biolabs).

16.0 plasmídeo pBR322 (Bolivar et al., Gene, 2:75) foi cortado com Hind III.

17.0 fragmento contendo a região delimitante esquerda descrita no passo 15 foi ligada ao pBR322 digerido com Hind III.

18.0 plasmídeo pBR322 contendo a região delimitante esquerda do passo 17 foi digerida com ClaI e Hind III e isolado o fragmento Hind III/Cla I de 1,1 kb. [Hepburn et al., J. Mol. Allp. Genet., 2:211 (1983)].

19.0 plasmídeo pUC18 [Norris et al., Gene, 26,101 (1983)] foi cortado com Hind III e Eco RI; o poliadaptador de 60 pb foi marcado nos extremos usando poli-

nucleotídeo cinase de T4 e gama ^{32}P -dATP e isolado do gel de acrilamida.

20.0 plasmídeo pBR322 foi cortado com Eco RI e Cla I e isolado o fragmento maior.

21.0 poliadaptador Hind III/Eco RI de 60 pb e o fragmento Hind III/Cla I de 1,1 kb de Eco RI 29 foram ligados ao pBR322 cortado com Cla I e Eco RI, constrindo pCIB 5 (passos 15 a 21 ver Figura 7a).

22. Um gene quimérico conferindo resistência à canamicina (nos-neo-nos) foi retirado de Bin 6 [Bevan, Nucleic Acids Res., 12: 8711 (1984)] como um fragmento Sal I/Eco RI.

23.0 plasmídeo pUC 18 foi cortado com Eco RI e Sal I.

24.0 fragmento Sal I/Eco RI contendo o gene quimérico do passo 22 foi ligado ao pUC 18 cortado com Eco RI e Sal I.

25.0 sítio de recombinante de Bam HI na sequência de terminação deste que quimérico foi destruído cortando com Bam HI, preenchendo com DNA polimerase de T4 e ligando.

26.0 plasmídeo resultante foi cortado com Sst II (Bethesda Research Laboratories) e Hind III.

27. Um fragmento contendo a parte 5' do promotor nos e a região delimitante direita de pTiT37 foram isolados cortando pBR325 (Hind 23) com Hind III e Sst II e isolando o fragmento de 1,0 kb.

28. Este fragmento Hind III/Sst II de 1,0 kb foi ligado a pUC18 cortado com enzimas de restrição do passo 26, construindo pCIB 4 (passos 22 a 28 ver Figura 7b).

29. pCIB5, contendo a região delimitante esquerda de T-DNA foi cortado com Aat II, dotado de extremos cegos por tratamento com DNA polimerase de T4 e depois cortado com Eco RI.

30. pCIB4 foi cortado com Hind III, dotado de extremos cegos por tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase de E. coli e cortado com Eco RI.

31. pCIB5 cortado com enzimas de restrição do passo 29 foi ligado ao pCIB4 cortado com enzimas de restrição (passo 30), construindo pCIB2, um replicação Col E1 contendo regiões delimitantes esquerda e direita de T-DNA delimitando um gene quimérico de resistência à canamicina e um poliadaptador (passos 29 a 31 ver Figura 7c).

32. O plasmídeo pRZ102 [Jorgenser et al Mol. Gen. Genet., 177:65 (1979)] foi digerido com Bam HI e preenchido usando Klenow.

33. Foi feita uma digestão parcial do plasmídeo pAO3 com Ala I [OKa, J. Mol. Biol., 174:217 (1981)]

34. O produto da digestão com Ala foi ligado ao pRZ 102 cortado com enzimas de restrição do passo 32 atrás, seleccionando os transformantes pretendidos por resistência à canamicina.

35. O plasmídeo resultante tem a sequência codificadora de Tn 903 presente num fragmento Bam HI de 1,05 kb que foi isolado após digestão com Bam HI. Este frag-

mento foi tratado com DNA polimerase Klenow.

36.0 plasmídeo pRK 252, um derivado do plasmídeo de larga gama de hospedeiros RK2 foi obtido do Dr. Don Helinski da Universidade da Califórnia, San Diego. Este plasmídeo não possui o sítio Bgl II presente no plasmídeo parental pRK290 [Ditta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 77; 7347 (1980)]. pRK252 foi digerido com Sna I e Sal I, preenchido com Klenow e isolado o fragmento grande resultante desta digestão.

37.0 fragmento cortado Tn 903, isolado no passo 35, foi ligado ao fragmento grande de pRK 252, construindo pRK252 km (passos 32 a 37 ver Figura 7d).

38.0 plasmídeo pRK252 hm foi cortado com Eco RI, dotado de extremos cegos usando Klenow e provido de adaptadores Bgl II/New England Biolabs).

39.0 plasmídeo pCIB2 foi cortado com Eco RV e isolado o fragmento mais pequeno contendo a região delimitante direita e o nos-neo-nos. Este fragmento foi preenchido usando plomirase Klenow e dotado de adaptadores Bgl II (new England Biolabs).

40.0 fragmento Bgl II semelhante do passo 39 foi ligado com o pRK252 km contendo adaptadores do passo 38", produzindo pCIB10 (passos 38 a 40 ver Figura 7c).

CONSTRUÇÃO DE PCIB10 a:

41.O plasmídeo pRZ102 [Jorgensen et al., (1979)] foi digerido com Bam HI e preenchido com Klenow.

42.Foi feita uma digestão parcial do plasmídeo pAO₃ (Oka, et al., (1978)] com Alu I.

43.O produto da digestão com Ala I foi ligado a pRZ102 cortado com enzimas de restrição, do passo 32, seleccionando os transformantes pretendidos por resistência à canamicina.

44.O plasmídeo resultante tem a sequência codificadora de *tn* 903 presente num fragmento Bam HI de 1,05 kb; este fragmento foi isolado após digestão com Bam HI e preenchimento com Klenow.

45.O plasmídeo pRK290, um derivado do plasmídeo de larga gama de hospedeiros RK2, foi obtido do Dr. Don Helinski da Universidade da Califórnia, San Diego. pRK 290 foi digerido com Sma I e Sal I, preenchido com Klenow e isolado o fragmento grande resultante desta digestão.

46.O fragmento contendo *Tn* 903, isolado no passo 35 foi ligado ao fragmento grande de pRK290, construindo pRK 290 km.

47.O plasmídeo do passo 46 foi digerido com Bgl II, preenchido usando Klenow e ligados, destruindo o seu sítio Bgl II, para construir pRK 290 km (passos 41 a 47 ver Figura 7f).

48.O plasmídeo pRK 290 km foi cortado com Eco RI, dotado de extremos cegos usando Klenow e provido de adaptadores Bgl II (New England Biolabs).

49.O plasmídeo pCIB2 foi cortado com Eco RII e dotado de adaptadores Bgl II (new England Biolabs).

50. pCIB2 com adaptadores Bgl II do passo 39 de foi ligado ao vector do passo 47 constrindo pCIB10a (passos 48 a 50 ver Figura 7g).

Os passos 41 a 50 podem ser repetidos substituindo o plasmídeo pRK290 por pRK252.

EXEMPLO VI

CONSTRUÇÃO DE pCIB 23 E pCIB 24, VECTORES QUE TRANSFEREM A ENZIMA GST PARA O CLOROPLASTO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS

O plasmídeo pSRS2.1, que contem a sequência 5' da subunidade pequena da ribulose bis-fosfato carboxilase (RuBPC) [Berry-Lowe *et al.*, *J. Mol. Appl. Gent.*, **1**: 483-498 (1982)] foi obtido do Dr. Rixhard Meagher do Departamento de Genética, Universidade da Geórgia, Athens, Georgia 30002. Este plasmídeo foi digerido com Eco RI. O fragmento de 2,1 kb contendo a região SSU 5' de soja foi isolado de um gel de agarose. O fragmento Eco RI de 2,1 kb foi digerido com Dde I. Um fragmento Dde I de 471 pb foi isolado. Este fragmento contem o peptídeo de transferência e uma porção do segundo exão.

O fragmento Dde I de 471 pb foi tratado com DNA polimerase Klenow (New England Biolabs). Um adaptador Bgl II fosforilado $\angle$ d(CAGATCTG) New England Biolabs) foi ligado a este fragmento. Este fragmento Bgl II foi digerido com Tag I. Os fragmentos Tag I resultantes foram tratados com DNA polimerase Klenow (Bethesda Research Labs). Os fragmentos de extremos cegos resultantes foram ligados a adaptadores Bam HI fosforilados $\angle$ d(CGCGGATCCGGCG) New England Biolabs] e purificados. Estes fragmentos Bam HI foram digeridos com Bgl II e Bam HI. Um fragmento Bam HI/Bgl II de aproximadamente 100 pb foi purificado; este fragmento contém a região SSU5'.

pCIB710 foi cortado com Bam HI e tratado com fosfatase alcalina de intestino de vitela. O fragmento Bam HI/Bgl II de 400 pb foi ligado a este pCIB710. Esta ligação foi usada para transformar E. coli HB101 e os transformantes selecionados em ampicilina.

Foram encontrados transformantes portadores do fragmento Bam HI/Bgl II em ambas as orientações. pSCR2 tem a região 5' do peptídeo de transferência adjacente ao promotor de 35S. pSCR1 tem o fragmento Bam HI/Bgl II na orientação oposta.

pCIB 12 foi digerido com Bam HI e o fragmento Bam HI de 708 pb portador do gene GST foi isolado. O plasmídeo pSCR2 foi cortado com Bam HI e tratado com fosfatase alcalina de intestino de vitela. O fragmento Bam HI de 700 pb do pCIB12 foi ligado a pSCR2 tratado com Bam HI. A mistura de ligação foi usada para transformar HB101 e os transformantes selecionados em ampicilina.

Encontraram-se transformantes portadores do gene GST em ambas as orientações relativamente às re-

giões reguladoras 5'. O clone pCIB22 tem o gene GST na orientação correcta para a transcrição a partir do promotor de CaMV. O clone pCIB21 tem o gene GST na orientação oposta. pCIB22 foi digerido com xba I e Eco RI. O fragmento portador do gene quimérico foi purificado de um gel.

O plasmídeo pCIB 10 foi digerido com xba I e Eco RI. O fragmento xba I/Eco RI portador do gene quimérico foi ligado ao pCIB10 digerido e os transformantes seleccionados por resistência à canamicina. O plasmídeo resultante, pCIB24 é um plasmídeo de uma gama larga de hospedeiros que possui o gene quimérico GST ligado a uma sequência peptídica de transferência para o cloroplasto.

Usando manipulações semelhantes e começando com o clone pCIB21 em vez de pCIB22, construiu-se um plasmídeo pCIB23. Este plasmídeo é portador do gene GST na orientação oposta ao gene GST de pCIB24.

Estes plasmídeos foram introduzidos em estirpes de Agrobacterium de modo idêntico ao pCIB13 e ao pCIB14 acima.

EXEMPLO VII

CONSTRUÇÃO DE pCIB 42, UM PLASMÍDEO AUXILIAR DE VIR AGROPI- NE PORTADOR DE UM GENE DE RESISTÊNCIA À DROGA ESPECTINOMICI- NA EM LUGAR DO T-DNA:

O plasmídeo Ti, pTiBo-542 [Sciaky, D., Montoga, A.L. & Chilton, M-D, Plasmid, 1:238-253 (1978)] é interessante porque as Agrobactérias deste plasmídeo Ti são capazes de infectar os legumes agronomicamente importantes, alfafa e soja. [Hood, E.E., et al., Bio (Technology, 2:702-708 (1984)]. Foi descrita a construção de um derivado de pTiBo 542 deleccionado no T-DNA [Hood, Elizabeth E., (1985) tese de Ph. D.; Universidade de Washington, St. Louis, Mo.]. Nesta construção designada EHA 101, o T-DNA foi substituído pelo gene de resistência à canamicina. A construção parental de EHA101, A281, está depositada na ATCC, de signada ATCC N^o53487. Foi construído um derivado de EHA 101 tendo o gene de resistência à canamicina substituído por um gene de resistência à espectinomicina. O plasmídeo p pi delta 307 [E. Hood, Universidade de Washington, tese (1985)] tem uma região de 1,7 kb de homologia para a esquerda de Bam a de p Ti Bo 542 [Hood, et al., (1984)] e uma região de homologia de Bkb para a direita de Bam 2a do pTi Bo 542, separados por um sítio único Eco RI. O plasmídeo pMON30, ATCC N^o67113, é portador do gene de resistência à espectinomicina/estreptomicina (spc)str de Tn7 [Hollingshead, S e Vapmek, D., Plasmid, 13: 17-30 (1980)]. pMON30 foi digerido com Eco RI o fragmento de 5,5 kb contendo o gene spc/str isolado de um gel de agarose e ligado ao plasmídeo p pi delta 307 cortado com Eco RI. O recombinante pretendido foi seleccionado como um transformante resistente à espectinomicina (50 µg/ml) resistente à tetraciclina (10 µg/ml). Este plasmídeo foi usado para transformar Agrobacterium Al36/EHA101

e seleccionado sem fenótipo resistente à estreptomicina, resistente à tetraciclina resistente à canamicina. Os derivados [Matzke, A.J.M. & Chilton, M-D, J. Mol. Appl. Genet. 1: 39-49 (1981)] de EHA101 e o plasmídeo da espectinomícina foram seleccionados após introdução do plasmídeo de evicção R 751-pMG-2 [Jacoby, G. et al., J. Bacteriol. 127: 1278-1285 (1976)] e selecção em gentamicina (52 µg/ml) e espectinomícina. O derivado pretendido tinha um fenótipo resistente à gentamicina, resistente à espectinomícina, sensível à tetraciclina e sensível à canamicina. A estrutura do plasmídeo resultante foi conformada por hibridação de transferências Southern com sondas.

EXEMPLO VIII

ENSAIOS COM PLANTAS PARA A TOLERÂNCIA À ATRAZINA:

Plantas do tabaco regeneradas portadoras das construções do gene GST pCIB14 são tolerantes à atrazina conforme determinado por várias medições incluindo:

- (1) indução de fluorescência; e
- (2) capacidade de produtos da germinação de sementes para crescerem em níveis de atrazina tóxicos para plantas testemunha ou selvagens.

Os ensaios de indução de fluorescência são uma indicação do estado do sistema fotoquímico da planta. [Voss et al., Weed Science, 32:675-680 (1984)]. Em tais ensaios, o tecido das folhas é irradiado com luz de comprimento de onda característica e registada a fluorescência re-

sultante num segundo comprimento de onda. A Figura 5 ilustra o padrão de indução de fluorescência típico de uma folha de tabaco cortada (não transformada/ infiltrada com solução tampão por tomada através do pecíolo cortado (folha) (curva inferior). Vê-se uma subida acentuada na fluorescência quando a luz é acesa, depois um pico seguido de um decaimento lento do sinal ao longo do tempo. Este padrão indica que os cloroplastos estão a ser excitados pela luz incidente e fluorescem a um comprimento de onda característico do sistema. Neste ponto a energia é canalizada para fora do fotossistema como fluxo de electrão ao longo da cadeia de transporte de electrões do fotossistema II e I-isto é indicado pela curva de decaimento suave de sinal de fluorescência. Se, no entanto, a folha fôr infiltrada com uma solução de atrazina 10^{-5} M, vê-se um padrão como a curva superior da Figura 5. Aqui, a energia luminosa é absorvida, os cloroplastos são excitados e emitem fluorescência mas não ocorre canalização de energia porque o fluxo de electrões está bloqueado no passo de ligação da quinoma do fotossistema II. É como se o fotossistema estivesse congelado no estado excitado. Assim observa-se uma subida acentuada da fluorescência seguido da ausência de qualquer decaimento.

Quando tais medições foram efectuadas em plantas de tabaco alteradas por engenharia genética de acordo com este intento na presença de atrazina 10^{-5} M todas as plantas testemunha apresentam padrões de indução de fluorescência idênticos ao do tabaco não transgénico. Quando foram feitas medições nas plantas experimenatis eles caíram em três classes de acordo com os seus padrões de indução da fluorescência (Figura 6).

Algumas das plantas transgénicas não apresentaram evidência de destoxificação da atrazina (a curva do topo), algumas apresentaram uma destoxificação modesta

(curva do meio) e alguns apresentaram uma destoxificação significativa da atrazina (curva de baixo) conforme evidenciado pela canalização normal de electrões ao longo do fotossistema. Das 27 plantas caracterizadas deste modo, 5 mostraram evidência significativa da capacidade para destoxificar a atrazina.

EXEMPLO IX

INFECÇÃO DE MATERIAL VEGETAL POR AGROBACTERIUM:

Os diferentes genótipos de Agrobacterium tumefaciens foram crescidos em meio mínimo AB [Watson, B. et al., J. Bacteriol. 123: 255-264 (1975)] mais manitol durante 48 horas a 28°C. As bactérias foram sedimentadas, ressuspensas em meio MSBN numa diluição de duas vezes e mantidas durante três horas a 25°C. [O meio MSBN foi preparado com uma mistura comercial (KC Biologicals) para dar as concentrações de macro e micronitrientes de acordo com Murashige e Skorg com as seguintes edições (em concentrações finais): benziladenina (mg/ml); ácido naftilacético (0,1 mg/l; mioinositol (1 mg/l); ácido nicotínico (1 mg/l); piridocina (1 mg/l); tiamina HCl (10 mg); e sacarose 30 mg/l)]. O pH foi ajustado a 5,7-5,8. Os discos de folhas de plantas de Nicotiana tabacum cv. petite Havana SR1 cultivadas in vitro foram postos a flutuar na suspensão bacteriana durante 10 minutos numa modificação de método de Horsch, R. et al., Science, 227: 1229-1231 (1985). Eles foram então transferidos para papel de filtro em MSBN sem antibióticos. Às 48 horas os discos das folhas foram mergulhadas em MSBN líquido 500 mg/l de carlenicilina e transferidos para meio de selecção sólido contendo 100 mg/l de canamicina e 500 mg/l de carlenicilina.

MATURAÇÃO DAS PLANTAS E AUTOPOLINIZAÇÃO:

Rebentos que surgiram de calos em meio selectivo foram removidos, transferidos para OHS com 100 mg/l de canamicina e 250 mg/l de carbenicilina e continuado o desenvolvimento durante três semanas. Eles foram então plantados nosolo e transferidos para a estirpe. As flores formaram-se quatro a oito semanas após a transferência para a estufa. A medida que uma flor abria e as suas anteras a para autopolinizar cada flor esfregando as anteras no estigma. As cápsulas com sementes ficaram maduras em 40 dias.

Ensaio com sementes derivados de plantas testemunhas, transgênicas testemunhas e transformadas experimentalmente:

As sementes foram primeiro removidos a-xêmicamente a partir de cápsulas maduras e guardadas em placas de petri estéreis. As sementes foram então colocadas em meio de germinação de sementes semi-duro ("SGM") compreendendo os macro e micronutrientes de Murashige & Skorg (KC Biológicas) na sua totalidade, 1 mg/l de hidrocloreto de tiamina e 0,6% de agar purificado (Difeo). Adicionou-se atrazina grau de pureza como litico, ao meio em concentrações de 10^{-7} 3×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 8×10^{-7} M e 10^{-6} M. O crescimento e sobrevivência do produto de germinação das sementes foi testado nestas concentrações e no nível zero de atrazina em 14 dias, os resultados estão apresentados na Tabela 1 abaixo. Todas as plantas testemunha e plantas transgênicas testemunhas germinaram mas não cresceram para além da fase de cotilédone em concentrações de atrazina de 5×10^{-7} M ou superiores. Entre o material germinado que cresceu a partir de sementes de todas as plantas pCIB14 antufecundadas, aproximadamente 75% permaneceu verde e produziu folhas primárias a 5×10^{-7} M, enquanto que o material germinado em concentrações de atrazina de

$8 \times 10^{-7} M$ ou superiores formou apenas cotilédones antes de ficar esbranquiçado e morrer. Apesar do material germinado tolerante não crescer tão bem no meio com atrazina como no meio sem atrazina ele pôde ser facilmente distinguido do material germinado sensível no mesmo meio.

Concentração de atrazina

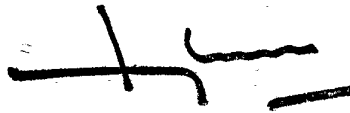
Genótipo do material
de germinação das se-
mentes

	$10^{-7} M$	$3 \times 10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$8 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$
Testemunha	+	+	o	o	o
LBA 4404	+	+	o	o	o
Bin 6	+	+	o	o	o
pCIB 13	+	+	o	o	o
pCIB 14	+	+	+	o	o

LEGENDA DA TABELA: É apresentada a diferença no crescimento e sobrevivência entre a progênie de plantas transgênicas pCIB14 e de todas as testemunhas. Uma resposta de crescimento positivo está indicado por + enquanto que o indica ausência de crescimento.

Se bem que o invento tenha sido descrito em algum detalhe através de ilustração e exemplos para uma melhor clareza e compreensão será óbvio que certas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do âmbito do invento limitado apenas pelas reivindicações apensas.

Dentro do âmbito do presente invento não de só as moléculas de DNA tendo a sequência de nucleotídeos concreta apresentada e codificando um polipeptídeo glutatio na S-transferase são uma execução do presente invento mas tam



- 63 -

bém as suas variantes e mutantes codificadoras de polipeptí-
deos que apresentam actividade de glutathione S-transferase.

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a construção de uma molécula de DNA recombinante que confere tolerância a herbicidas a uma planta por destoxificação dos herbicidas, caracterizado por compreender a ligação de porções de sequências de DNA consistindo em DNA genómico ou cDNA para formar a sequência codificadora da glutathione S-transferase na sua totalidade por métodos conhecidos na especialidade.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a ligação das sequências de DNA ser efectuada por recombinação in vivo de sequências de DNA tendo regiões de homologia e/ou por ligação in vitro de fragmentos de restrição adequados.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas porções de sequências de DNA compreenderem DNA genómico e cDNA.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas porções de sequências de DNA compreenderem porções de genes de vários organismos de mais do que um género.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas porções de sequências de DNA compreenderem porções de genes de mais de uma estirpe, variedade ou espécie do mesmo organismo.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas porções de sequência de DNA compreenderem porções de mais do que um gene do mesmo organismo.

7ª. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a referida sequência de DNA codificadora de um polipeptídeo glutational S-transferase ser de um mamífero.

8ª. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a referida sequência de DNA codificadora de um polipeptídeo glutational S-transferase ser de uma ratazana.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida sequência de DNA codificadora de um polipeptídeo glutational S-transferase de ratazana compreender a seguinte sequência de nucleotídeos.

40 50 60
 ATGCCTATGATACTGGGATACTGG
 M P M I L G Y W
 70 80 90 100 110 120
 AACGTCCGCGGGCTGACACACCCGATCCGCTGCTCCTGGAATACACAGACTCAAGCTAT
 N V R G L T H P I R L L L E Y T D S S Y
 130 140 150 160 170 180
 GAGGAGAAGAGATACGCCATGGGCGACGCTCCCGACTATGACAGAAGCCAGTGGCTGAAT
 E E K R Y A M G D A P D Y D R S Q W L N
 190 200 210 220 230 240
 GAGAAGTTCAAACCTGGGCTGGACTTCCCAATCTGCCCTACTTAATTGATGGATCGCGC
 E K F K L G L D F P N L P Y L I D G S R
 250 260 270 280 290 300
 AAGATTACCCAGAGCAATGCCATAATGCGCTACCTTGCCCGCAAGCACCTGTGTGGA
 K I T Q S N A I M R Y L A R K H H L C G
 310 320 330 340 350 360
 GAGACAGAGGAGGAGCGGATTCGTGCAGACATTGTGGAGAACCAGGTCATGGACAACCGC
 E T E E E R I R A D I V E N Q V M D N R
 370 380 390 400 410 420
 ATGCAGCTCATCATGCTTTGTTACAACCCCGACTTTGAGAAGCAGAAGCCAGAGTTCTTG
 M Q L I M L C Y N P D F E K Q K P E F L
 430 440 450 460 470 480
 AAGACCATCCCTGAGAAGATGAAGCTCTACTCTGAGTTCCTGGGCAAGCGACCATGGTTT
 K T I P E K M K L Y S E F L G K R P W F
 490 500 510 520 530 540
 GCAGGGGACAAGGTCACCTATGTGGATTTCCTTGCTTATGACATTCTTGACCACTACCAC
 A G D K V T Y V D F L A Y D I L D Q Y H
 550 560 570 580 590 600
 ATTTTGTAGCCCAAGTGCCTGGACGCCTTCCCAAACCTGAAGGACTTCCTGGCCCGCTTC
 I F E P K C L D A F P N L K D F L A R F
 610 620 630 640 650 660
 GAGGGCTGAAGAAGATCTCTGCCTACATGAAGAGCAGCCGCTACCTCTCAACACCTATA
 E G L K K I S A Y M K S S R Y L S T P I
 670 680 690 700 710 720
 TTTTCGAAGTTGGCCCAATGGAGTAACAAGTAG
 F S K L A Q W S N K

assim como seus mutantes e variantes codificadores de poli-
 peptídeos com actividade de glutathione S-transferase.

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida sequência de DNA codificadora de um polipeptídeo glutatona S-transferase de ratazana compreender a seguinte sequência de nucleotídeos.

1 10	13 0	
TAC AGC ATG GGG GAT GCT CCC GAC TAT GAC AGA AGC CAG		
Tyr Ser Met Gly Asp Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Ser Gln		
150	1 70	
TGG CTG AGT GAG AAG TTC AAA CTG GGC CTG GAC TTC CCC AAT CTG		
Trp Leu Ser Glu Lys Phe Lys Leu Gly Leu Asp Phe Pro Asn Leu		
19 0	210	
CCC TAC TTA ATT GAT GGG TCA CAC AAG ATC ACC CAG AGC AAT GCC		
Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ser His Lys Ile Thr Gln Ser Asn Ala		
2 30	25 0	270
ATC CTG CGC TAC CTT GGC CGG AAG CAC AAC CTT TGT GGG GAG ACA		
Ile Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Lys His Asn Leu Cys Gly Glu Thr		
2 90	31 0	
GAG GAG GAG AGG ATT CGT GTG GAC GTT TTG GAG AAC CAG GCT ATG		
Glu Glu Glu Arg Ile Arg Val Asp Val Leu Glu Asn Gln Ala Met		
330	3 50	
GAC ACC CGC CTA CAG TTG GCC ATG GTC TGC TAC AGC CCT GAC TTT		
Asp Thr Arg Leu Gln Leu Ala Met Val Cys Tyr Ser Pro Asp Phe		
37 0	390	
GAG AGA AAG AAG CCA GAG TAC TTA GAG GGT CTC CCT GAG AAG ATG		
Glu Arg Lys Lys Pro Glu Tyr Leu Glu Gly Leu Pro Gly Lys Met		
4 10	43 0	450
AAG CTT TAC TCC GAA TTC CTG GGC AAG CAG CCA TGG TTT GCA GGG		
Lys Leu Tyr Ser Glu Phe Leu Gly Lys Gln Pro Trp Phe Ala Gly		
4 70	49 0	
AAC AAG ATT ACG TAT GTG GAT TTT CTT GTT TAC GAT GTC CTT GAT		
Asn Lys Ile Thr Tyr Val Asp Phe Leu Val Tyr Asp Val Leu Asp		
510	5 30	
CAA CAC CGT ATA TTT GAA CCC AAG TGC CTG GAC GCC TTC CCA AAC		
Gln His Arg Ile Phe Glu Pro Lys Cys Leu Asp Ala Phe Pro Asn		
55 0	570	
CTG AAG GAC TTC GTG GCT CGG TTT GAG GGC CTG AAG AAG ATA TCT		
Leu Lys Asp Phe Val Ala Arg Phe Glu Gly Leu Lys Lys Ile Ser		
5 90	61 0	630
GAC TAC ATG AAG AGC GGC CGC TTC CTC TCC AAG CCA ATC TTT GCA		
Asp Tyr Met Lys Ser Gly Arg Phe Leu Ser Lys Pro Ile Phe Ala		
6 50		
AAG ATG GCC TTT TGG AAC CCA AAG TAG		
Lys Met Ala Phe Trp Asn Pro Lys		

assim como seus mutantes e variantes codificadores de polipeptídeos com actividade glutatona S-transferase.

11a. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida sequência de DNA codificadora de um polipeptídeo glutatona S-transferase de ratazanas compreender a seguinte sequência de nucleotídeos

1 0	30
ATG CCT ATG ACA CTG GGT TAC TGG GAC ATC CGT GGG CTG GCT CAC	
Met Pro Met Thr Leu Gly Tyr Trp Asp Ile Arg Gly Leu Ala His	
50	7 0
GCC ATT CGC CTG TTC CTG GAG TAT ACA GAC ACA AGC TAT GAG GAC	90
Ala Ile Arg Leu Phe Leu Glu Tyr Thr Asp Thr Ser Tyr Glu Asp	
1 10	13 0
AAG AAG TAC AGC ATG GGG GAT GCT CCC GAC TAT GAC AGA AGC CAG	
Lys Lys Tyr Ser Met Gly Asp Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Ser Gln	
150	1 70
TGG CTG AGT GAG AAG TTC AAA CTG GGC CTG GAC TTC CCC AAT CTG	
Trp Leu Ser Glu Lys Phe Lys Leu Gly Leu Asp Phe Pro Asn Leu	
19 0	210
CCC TAC TTA ATT GAT GGG TCA CAC AAG ATC ACC CAG AGC AAT GCC	
Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ser His Lys Ile Thr Gln Ser Asn Ala	
2 30	25 0
ATC CTG CGC TAC CTT GGC CGG AAG CAC AAC CTT TGT GGG GAG ACA	270
Ile Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Lys His Asn Leu Cys Gly Glu Thr	
2 90	31 0
GAG GAG GAG AGG ATT CGT GTG GAC GTT TTG GAG AAC CAG GCT ATG	
Glu Glu Glu Arg Ile Arg Val Asp Val Leu Glu Asn Gln Ala Met	
330	3 50
GAC ACC CGC CTA CAG TTG GCC ATG GTC TGC TAC AGC CCT GAC TTT	
Asp Thr Arg Leu Gln Leu Ala Met Val Cys Tyr Ser Pro Asp Phe	
37 0	390
GAG AGA AAG AAG CCA GAG TAC TTA GAG GGT CTC CCT GAG AAG ATG	
Glu Arg Lys Lys Pro Glu Tyr Leu Glu Gly Leu Pro Glu Lys Met	
4 10	43 0
AAG CTT TAC TCC GAA TTC CTG GGC AAG CAG CCA TGG TTT GCA GGG	450
Lys Leu Tyr Ser Glu Phe Leu Gly Lys Lys Gln Pro Trp Phe Ala Gly	

4 70		49 0
AAC AAG ATT ACG TAT GTG GAT TTT CTT GTT TAC GAT GTC CTT GAT		
Asn Lys Ile Thr Tyr Val Asp Phe Leu Val Tyr Asp Val Leu Asp		
510		5 30
CAA CAC CGT ATA TTT GAA CCC AAG TGC CTG GAC GCC TTC CCA AAC		
Gln His Arg Ile Phe Glu Pro Lys Cys Leu Asp Ala Phe Pro Asn		
55 0		570
CTG AAG GAC TTC GTG GCT CGG TTT GAG GGC CTG AAG AAG ATA TCT		
Leu Lys Asp Phe Val Ala Arg Phe Glu Gly Leu Lys Lys Ile Ser		
5 90	61 0	630
GAC TAC ATG AAG AGC GGC CGC TTC CTC TCC AAG CCA ATC TTT GCA		
Asp Tyr Met Lys Ser Gly Arg Phe Leu Ser Lys Pro Ile Phe Ala		
6 50		
AAG ATG GCC TTT TGG AAC CCA AAG TAG		
Lys Met Ala Phe Trp Asn Pro Lys End .		

assim como seus mutantes e variantes codificadores de polipeptídeos com actividade glutathion S-transferase.

12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida sequência de DNA codificadora de um polipeptídeo glutathion S-transferase de ratzana compreende a seguinte sequência de nucleotídeos.

10 30
 A GAC CCC AGC ACC ATG CCC ATG ACA CTG GGT TAC TGG GAC ATC
 Met Pro Met Thr Leu Gly Tyr Trp Asp Ile
 5 0 70
 CGT GGG CTA GCG CAT GCC ATC CGC CTG CTC CTG GAA TAC ACA GAC
 Arg Gly Leu Ala His Ala Ile Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Thr Asp
 90 11 0 130
 TCG AGC TAT GAG GAG AAG AGA TAC ACC ATG GGA GAC GCT CCC GAC
 Ser Ser Tyr Glu Glu Lys Arg Tyr Thr Met Gly Asp Ala Pro Asp
 1 50 17 0
 TTT GAC AGA AGC CAG TGG CTG AAT GAG AAG TTC AAA CTG GGC CTG
 Phe Asp Arg Ser Gln Trp Leu Asn Glu Lys Phe Lys Leu Gly Leu
 190 2 10
 GAC TTC CCC AAT CTG CCC TAC TTA ATT GAT GGA TCA CAC AAG ATC
 Asp Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ser His Lys Ile
 23 0 250 2
 ACC CAG AGC AAT GCC ATC CTG CGC TAT CTT GGC CGC AAG CAC AAC
 Thr Gln Ser Asn Ala Ile Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Lys His Asn
 70 29 0 310
 CTG TGT GGG GAG ACA GAA GAG GAG AGG ATT CGT GTG GAC ATT CTG
 Leu Cys Gly Glu Thr Glu Glu Glu Arg Ile Arg Val Asp Ile Leu
 3 30 35 0
 GAG AAT CAG CTC ATG GAC AAC CGC ATG GTG CTG GCG AGA CTT TGC
 Glu Asn Gln Leu Met Asp Asn Arg Met Val Leu Ala Arg Leu Cys
 370 3 90
 TAT AAC CCT GAC TTT GAG AAG CTG AAG CCA GGG TAC CTG GAG CAA
 Tyr Asn Pro Asp Phe Glu Lys Leu Lys Pro Gly Tyr Leu Glu Gln
 41 0 430 4
 CTG CCI GGA ATG ATG CGG CTT TAC TCC GAG TTC CTG GGC AAG CGG
 Leu Pro Gly Met Met Arg Leu Tyr Ser Glu Phe Leu Gly Lys Arg

50													47 0													490						
CCA	TGG	TTT	GCA	GGG	GAC	AAG	ATC	ACC	TTT	GTG	GAT	TTC	ATT	GCT	Pro	Trp	Phe	Ala	Gly	Asp	Lys	Ile	Thr	Phe	Val	Asp	Phe	Ile	Ala			
															5 10																53 0	
TAC	GAT	GTT	CTT	GAG	AGG	AAC	CAA	GTG	TTT	GAG	GCC	ACG	TGC	CTG	Tyr	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln	Val	Phe	Glu	Ala	Thr	Cys	Leu			
															550																5 70	
GAC	GCG	TTC	CCA	AAC	CTG	AAG	GAT	TTC	ATA	GCG	CGC	TTT	GAG	GGC	Asp	Ala	Phe	Pro	Asn	Leu	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Phe	Glu	Gly			
															59 0																610	6
CTG	AAG	AAG	ATC	TCC	GAC	TAC	ATG	AAG	TCC	AGC	CGC	TTC	CTC	CCA	Leu	Lys	Lys	Ile	Ser	Asp	Tyr	Met	Lys	Ser	Ser	Arg	Phe	Leu	Pro			
30																65 0																670
AGA	CCT	CTG	TTC	ACA	AAG	ATG	GCT	ATT	TGG	GGC	AGC	AAG	TAG	GAC	Arg	Pro	Leu	Phe	Thr	Lys	Met	Ala	Ile	Trp	Gly	Ser	Lys	End	Asp			
															6 90																71 0	
CCT	GAC	AGG	TGG	GCT	TTA	GGA	GAA	AGA	TAC	CAA	ATC	TCC	TGG	GTT	Pro	Asp	Arg	Trp	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Tyr	Gln	Ile	Ser	Trp	Val			
															730																7 50	
TGC	CAA	GAG	CCC	TAA	GGA	GCG	GGC	AGG	ATT	CCT	GAG	CCC	CAG	AGC	Cys	Gln	Glu	Pro	End	Gly	Ala	Gly	Arg	Ile	Pro	Glu	Pro	Gln	Ser			
															77 0																790	8
CAT	GTT	TTC	TTC	CTT	CCT	TCC	ATT	CCA	GTC	CCC	AAG	CCT	TAC	CAG	His	Val	Phe	Phe	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	Pro	Lys	Pro	Tyr	Gln			
10																83 0																850
CTC	TCA	TTT	TTT	GGT	CAT	CAA	ATT	CCT	GCC	AAA	CAC	AGG	CTC	TTA	Leu	Ser	Phe	Phe	Gly	His	Gln	Ile	Pro	Ala	Lys	His	Arg	Leu	Leu			
															8 70																89 0	
AAA	GCC	CTA	GCA	ACT	CCT	TTC	CAT	TAG	CAA	AAT	AGC	CTT	CTA	AAG	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Pro	Phe	His	End	Gln	Asn	Ser	Leu	Leu	Lys			
															910																9 30	
TTA	AAG	TGC	CCC	GCC	CCC	ACC	CCT	CGA	GCT	CAT	GTG	ATT	GGA	TAG	Leu	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Thr	Pro	Arg	Ala	His	Val	Ile	Gly	End			
															95 0																970	9
TTG	GCT	CCC	AAC	ATG	TGA	TTA	TTT	TGG	GCA	GGT	CAG	GCT	CCC	CGG	Leu	Ala	Pro	Asn	Met	End	Leu	Phe	Trp	Ala	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg			
90																101 0																1 030
CAG	ATG	GGG	TCT	ATC	TGG	AGA	CAG	TAG	ATT	GCT	ACC	AGC	TTT	GAC	Gln	Met	Gly	Ser	Ile	Trp	Arg	Gln	End	Ile	Ala	Ser	Ser	Phe	Asp			

1 090 11 10
TGA GCA AGG TGT GCT GTG TCC CCA GCA CTT GTC ACT GCC TCT GTA
End Ala Arg Cys Ala Val Ser Pro Ala Leu Val Thr Ala Ser Val

como seus mutantes e variantes codificadores de polipeptídeos com actividade de glutathione S-transferase.

14a. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a sequência de DNA ser heteróloga relativamente ao promotor vegetal.

15ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por as células vegetais serem cé-

lulas de tabaco, soja ou algodoeiro.

16ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por as células vegetais serem partes de uma planta completa.

17ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o referido promotor vegetal ser seleccionado de entre o promotor da subunidade pequena da ribulose bisfosfato carboxilase de soja e o promotor da ligação à clorofila a/b.

18ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o referido promotor vegetal ser seleccionado a partir do promotor da sub-unidade pequena da ribulose bi-fosfato carboxilase de soja e o promotor da proteína de ligação à clorofila a/b.

19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o herbicida, ser do tipo clo-roacetamida, sulfonilureia, triazina, éter difenílico, imidazolinona ou tiocarbamato.

20ª. - Processo para a construção de um vector de transferência de DNA caracterizado por compreender a ligação de uma sequência genética quimérica compreendendo o gene da glutathione S-transferase operacionalmente ligado a um promotor vegetal num vector de clonagem adequado contendo sequências para replicação e de controlo derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira.

21ª. - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por ser utilizado para a construção de um vector de expressão de DNA.

22ª. - Processo de acordo com a reivindicação 19 e 20, caracterizado por a célula hospedeira ser um microorganismo.

23ª. - Processo de acordo com as reivindicações 19 e 20, caracterizado por a célula hospedeira ser uma célula vegetal.

24ª. - Método para a produção de uma célula vegetal tolerante a herbicidas caracterizado por compreender a transformação de uma célula vegetal com a molécula de DNA recombinante de qualquer uma das reivindicações 1 a 14, por um dos seguintes processos:

a) Contacto dos protoplastos das células directamente com o DNA, ou

b) Contacto das células com vírus ou com Agrobacterium

25ª. - Método para produção de plantas tolerantes a herbicidas caracterizado por compreender a regeneração de plantas a partir de célula vegetal da reivindicação 23.

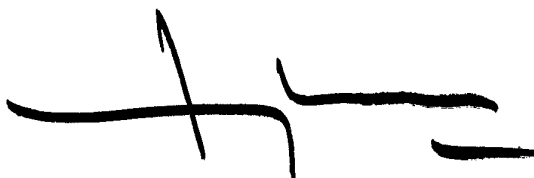
26ª. - Método para a produção de plantas tolerantes a herbicidas de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por as plantas serem seleccionadas do grupo de constituição

Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna,
Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica,
Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersi-
con, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium,
Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hemerocallis,
Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio,
Salpiglossis, Cucumis, Browallia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum,
Sorghum, Ipomoea, Passiflora, Cyclamen, Malus, Prunus, Rosa, Rubus,
Populus, Santalum, Allium, Lilium, Narcissus, Ananas, Arachis,
Phaseolus e Pisum.

27ª. - Método de controlo selectivo de plantas sensíveis a herbicidas dentro de uma população mista consistindo nas referidas plantas sensíveis aos herbicidas e nas plantas tolerantes aos herbicidas de acordo com a reinvindicação 24 ou 25, caracterizado por compreender o contacto da referida população mista com concentrações de herbicidas entre 0,5 kg e cerca de 2,0 kg/ha.

28ª. - Método de controlo selectivo de plantas sensíveis a herbicidas dentro de uma população mista consistindo nas referidas plantas sensíveis aos herbicidas e nas plantas tolerantes a herbicidas, de acordo com as reivindicações 25 e 26, caracterizado por compreender o contacto da referida população mista com um herbicida numa gama de concentrações entre 0,5 kg/ha e cerca de 2,0 kg/ha e com um sensibilizante.

Lisboa, 18 de Maio de 1987



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.º
1260 LISBOA

[Handwritten signature]

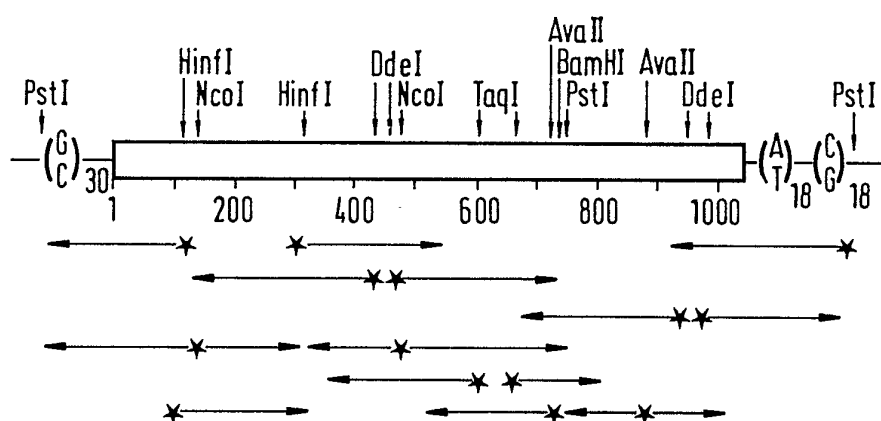
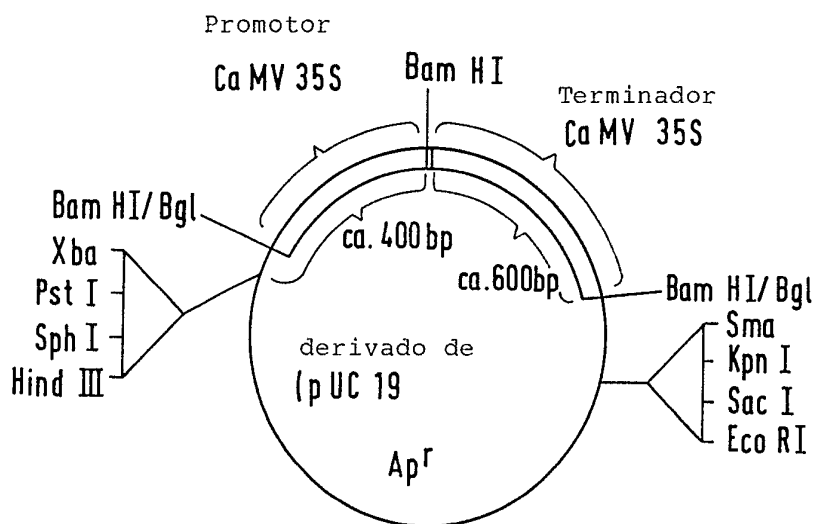


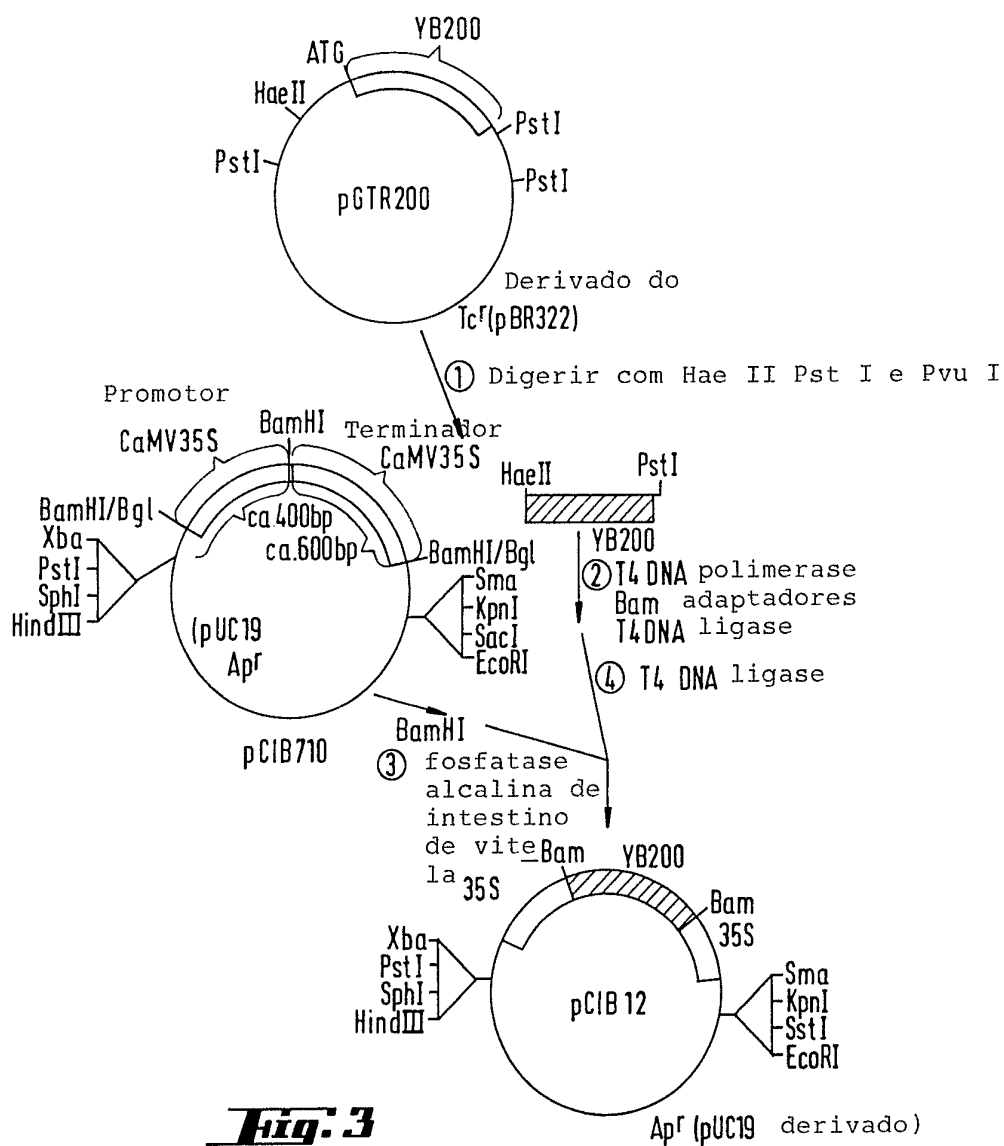
Fig. 1

[Handwritten signature]



p CIB 710

Fig. 2



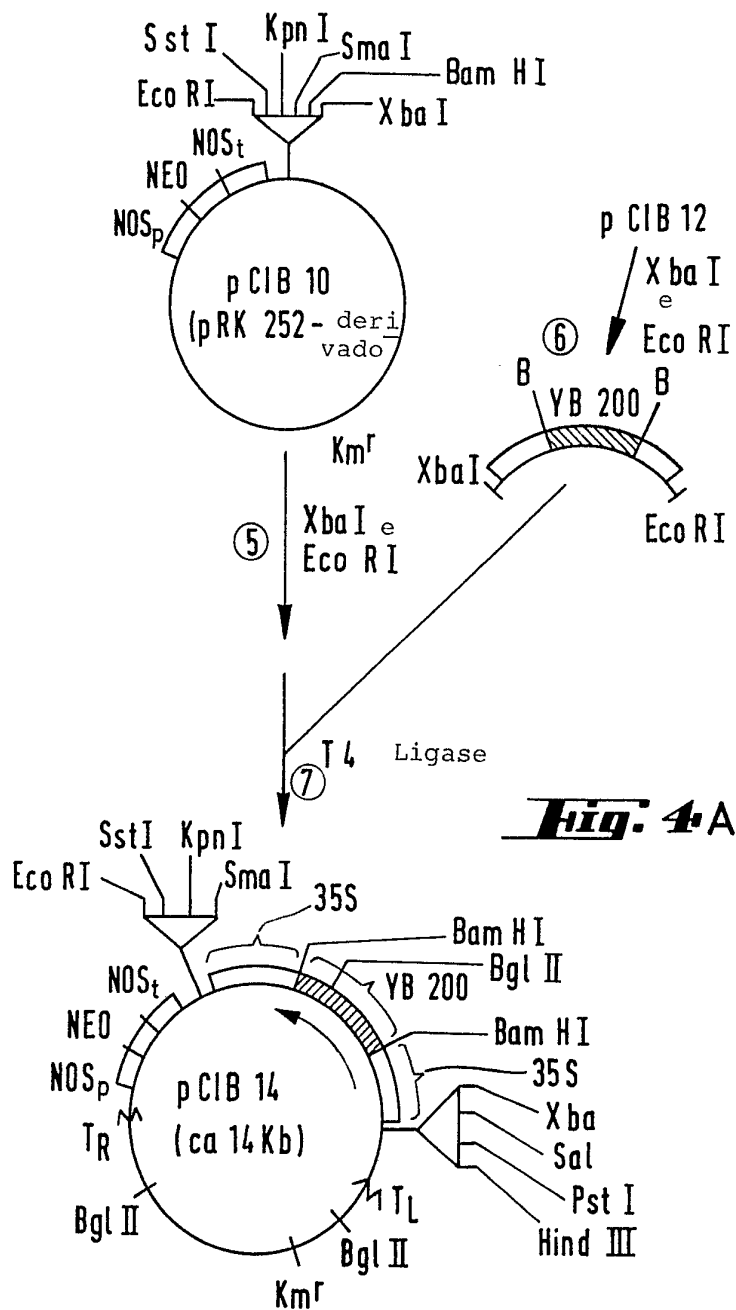


Fig. 4A

Método de Recombinação

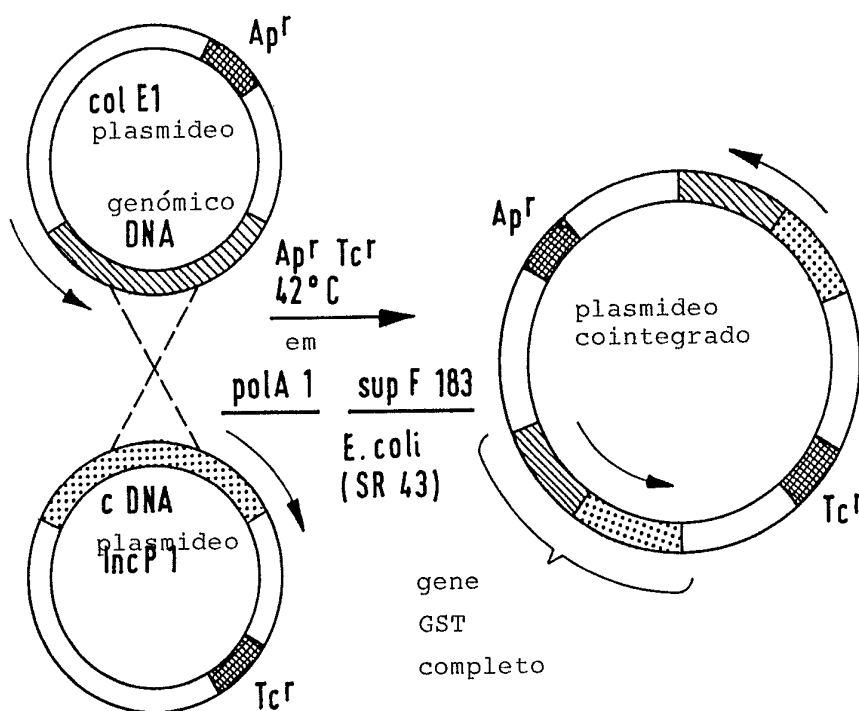


Fig. 4.B

Método de ligação in vitro

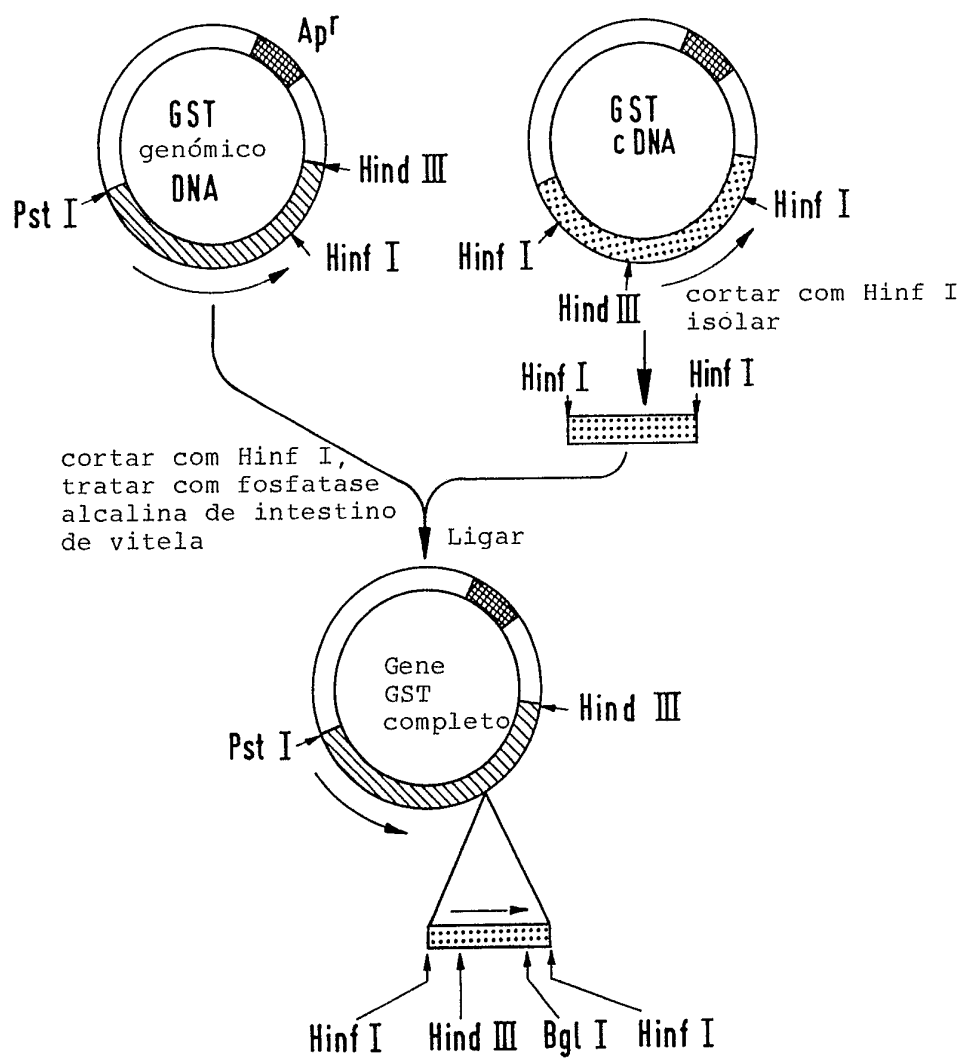


Fig. 4C

[Handwritten signature]

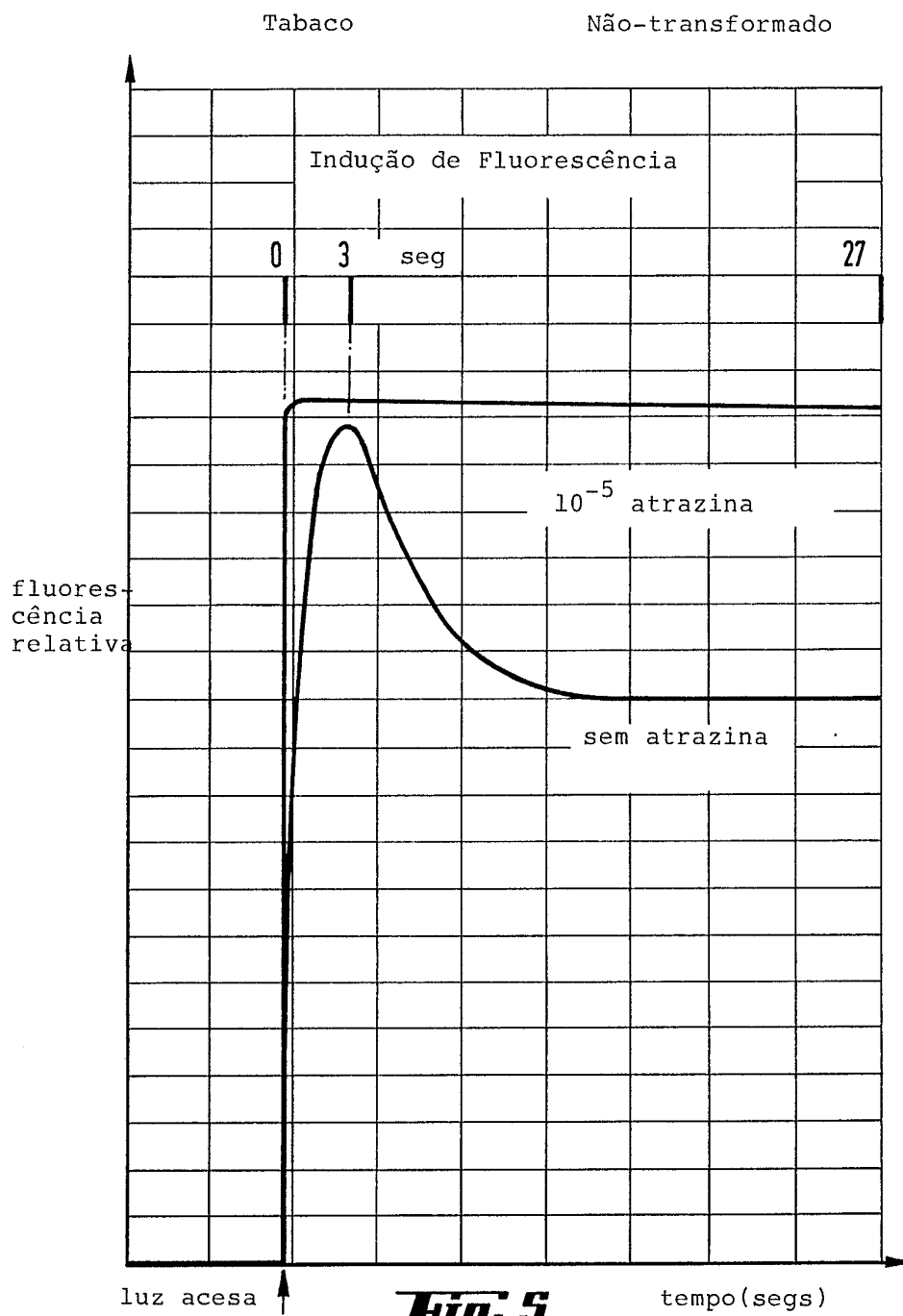


Fig. 5

[Handwritten signature]

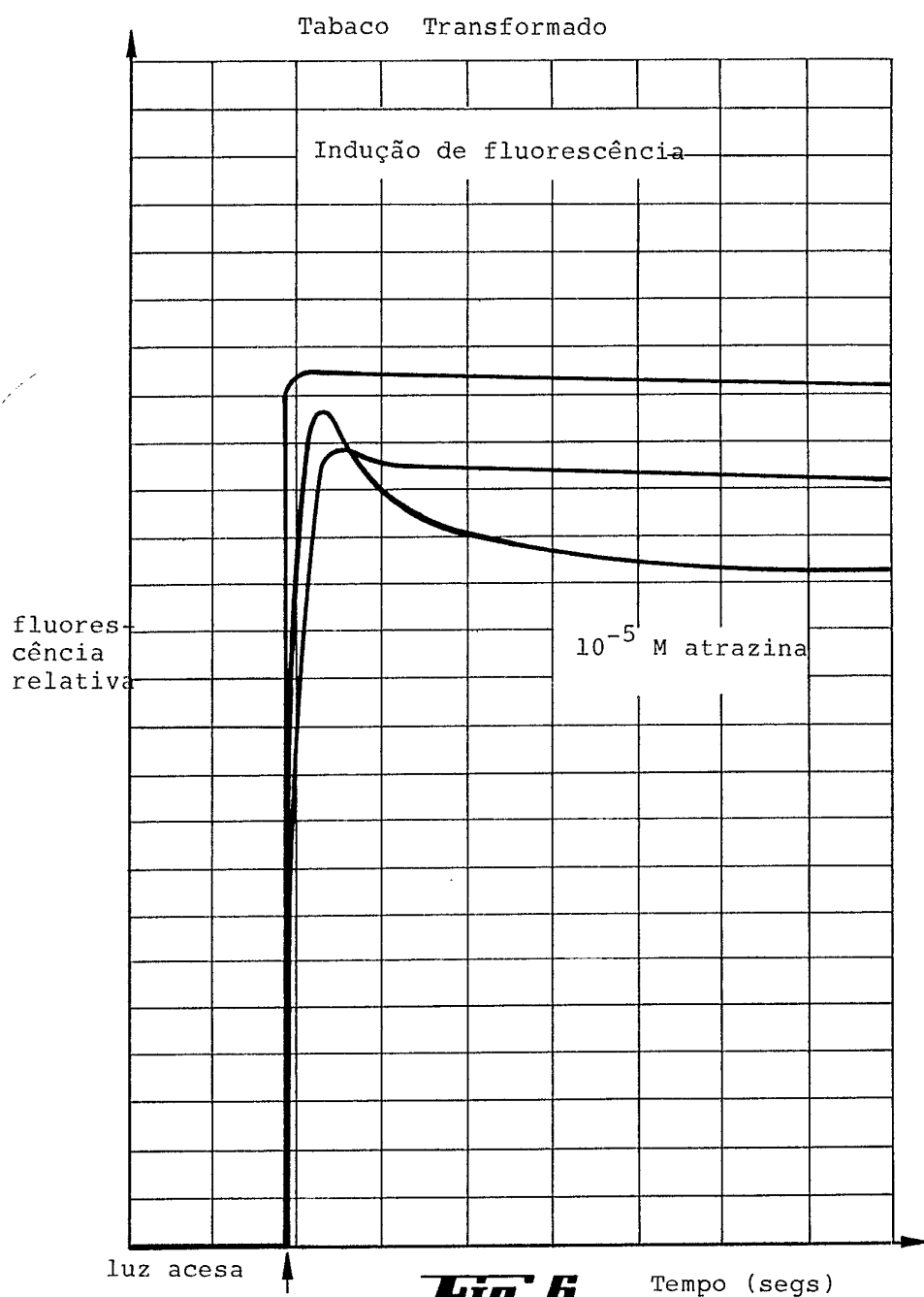


Fig. 6

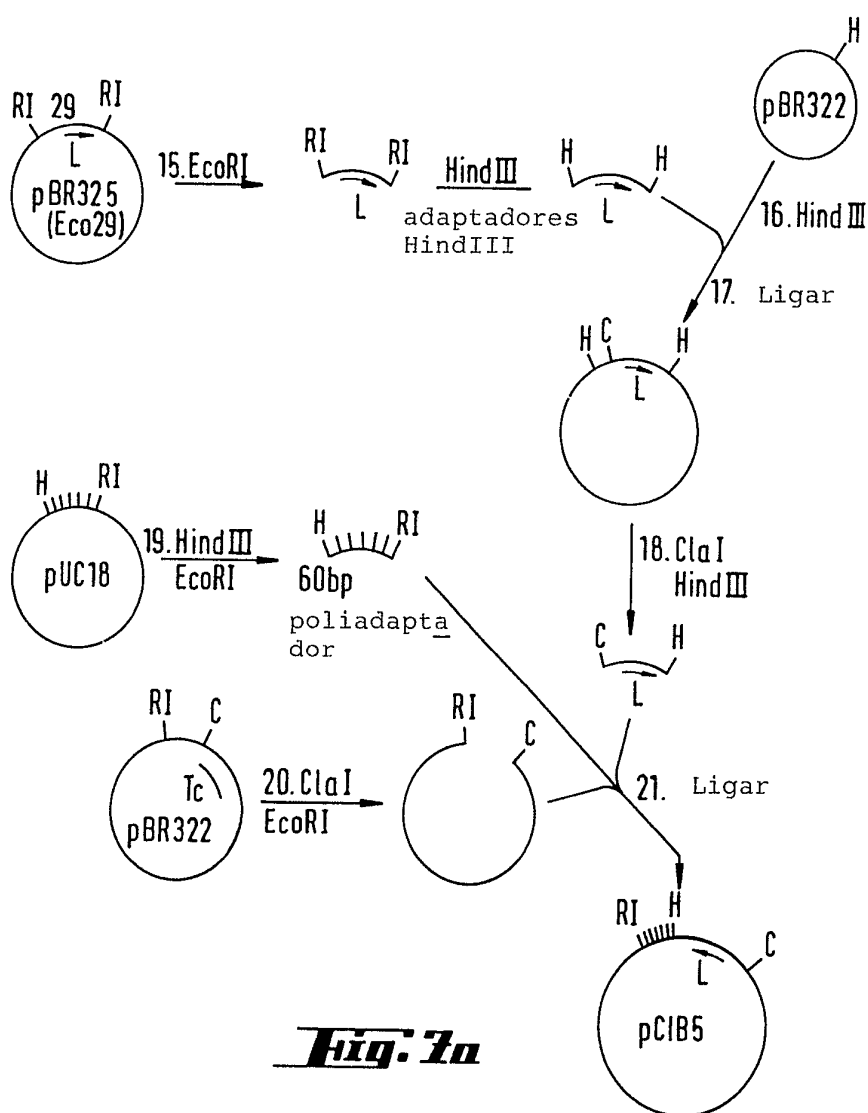


Fig. 7a

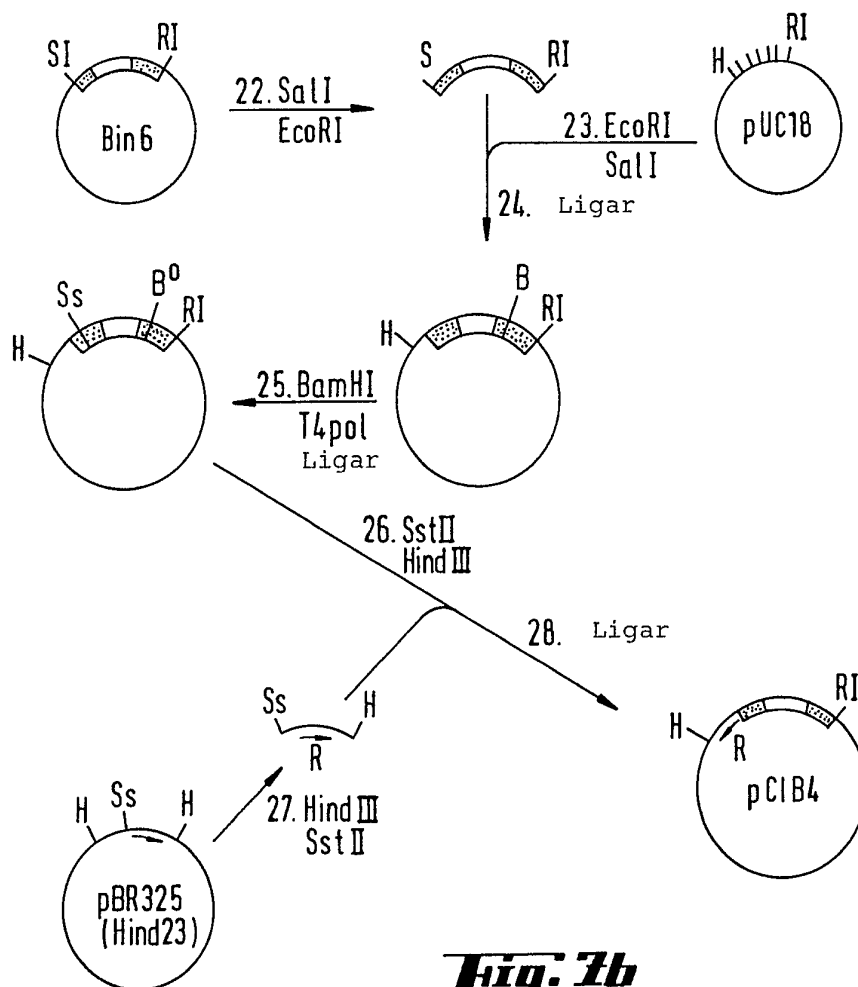


Fig. 7b

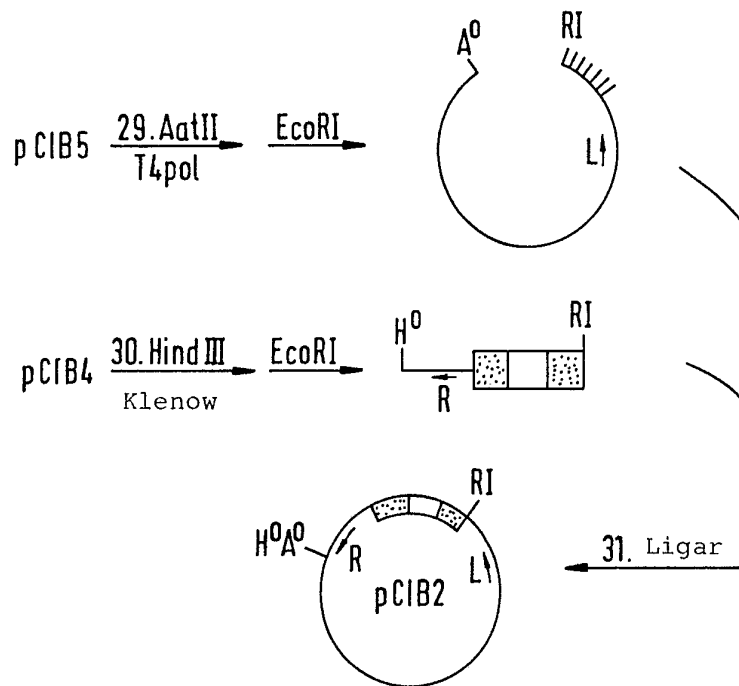


Fig. 7c

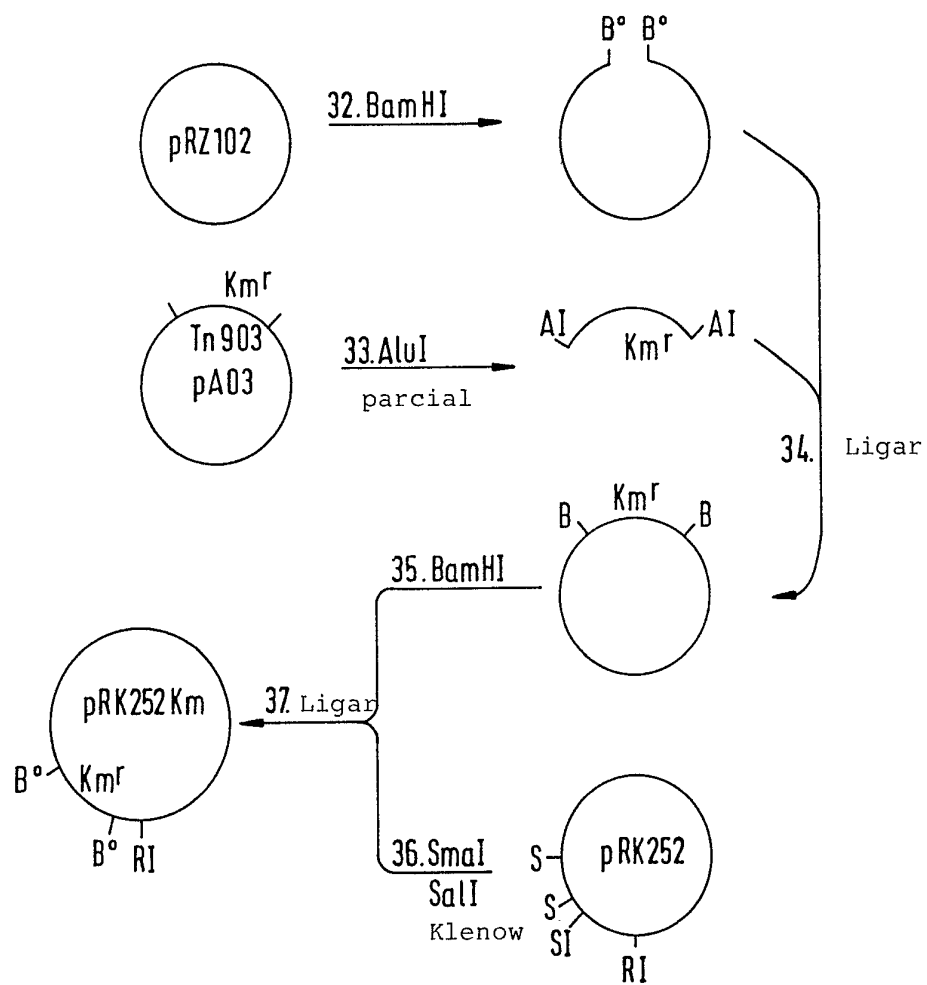
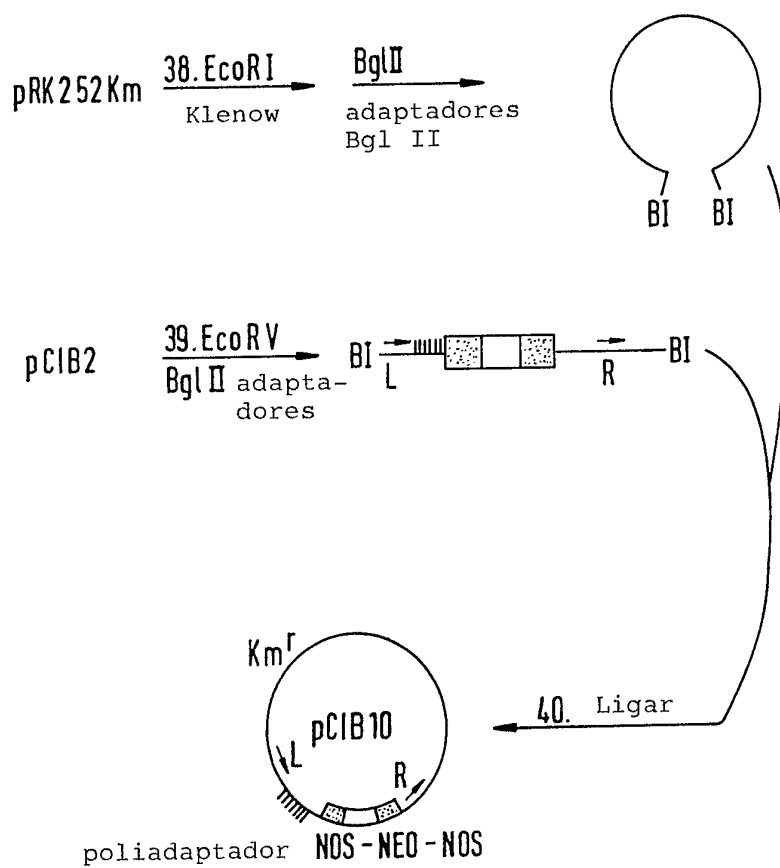


Fig. 7d

Fig. 1e



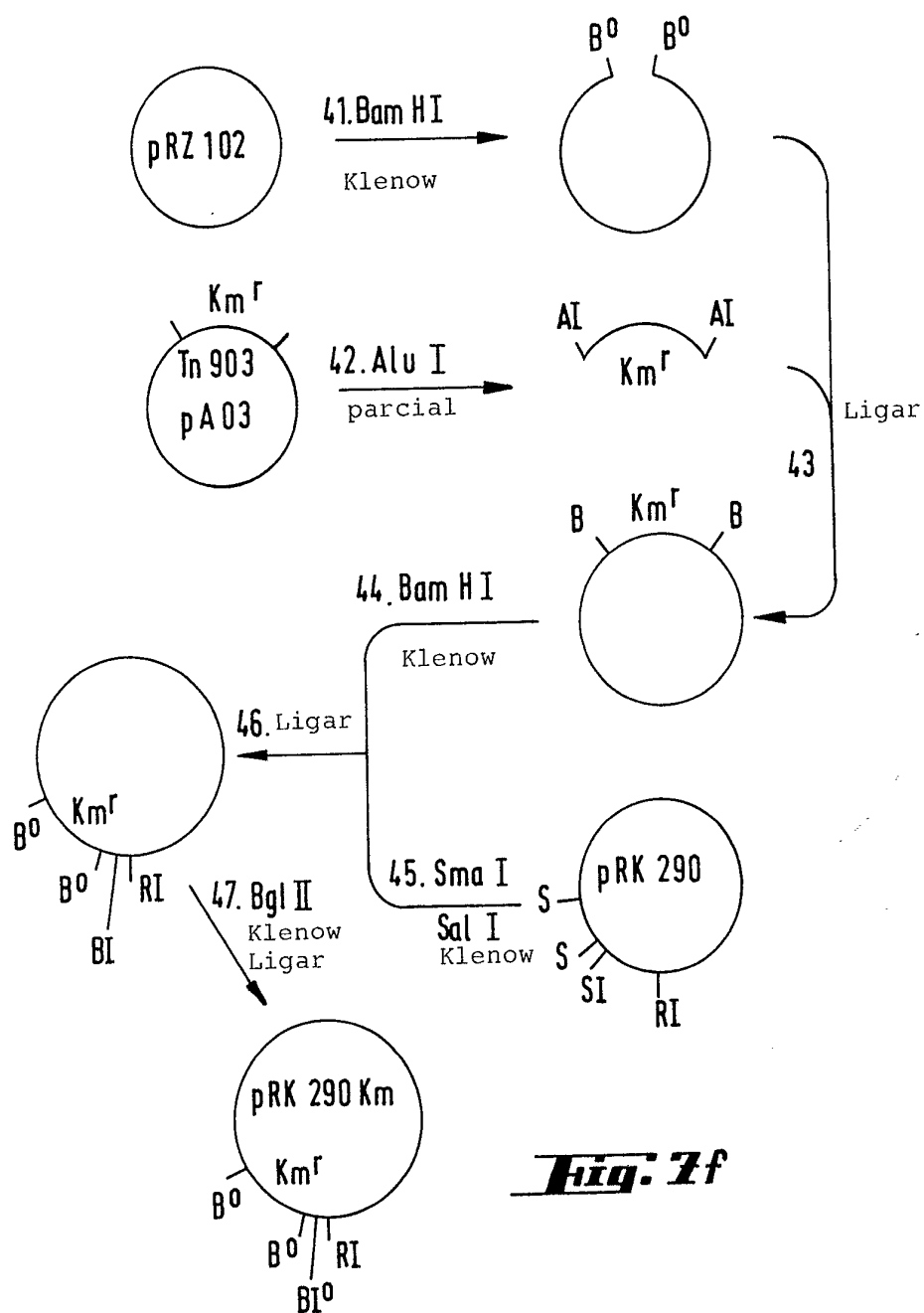


Fig. 7f

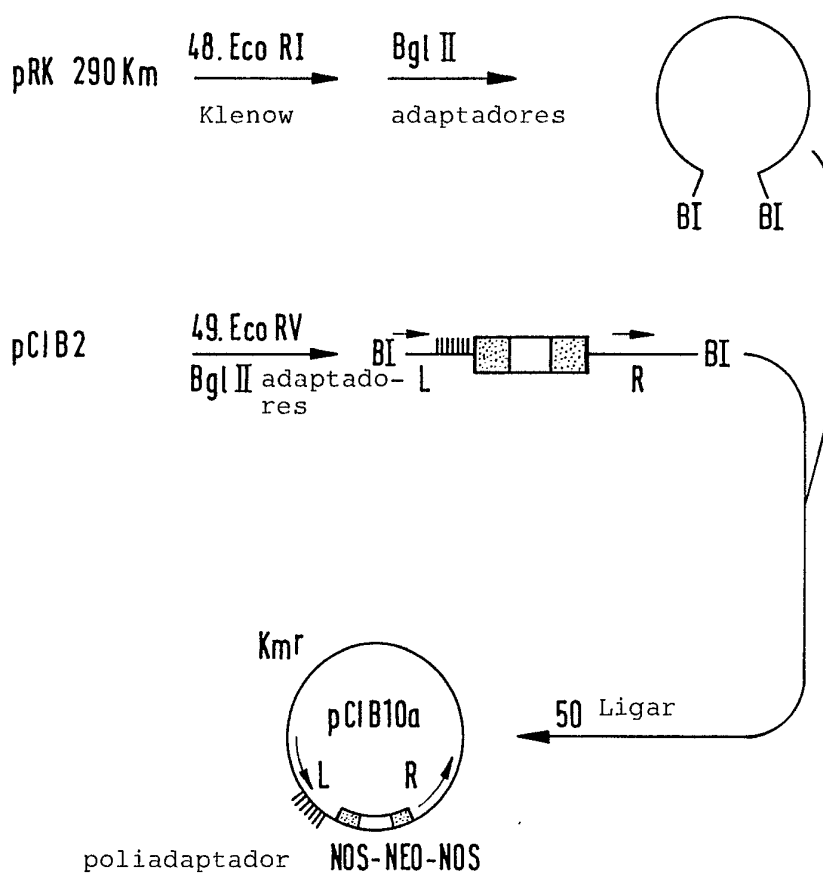


Fig: 7g