

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

(21) **PI0613153-0 A2**

(22) Data de Depósito: 19/06/2006  
(43) Data da Publicação: 21/12/2010  
(RPI 2085)



\* B R P I 0 6 1 3 1 5 3 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/82  
C12N 15/54  
C12N 15/04  
C12N 5/10  
A01H 5/00  
A01H 5/10

(54) **Título: MÉTODOS PARA ALTERAR A REATIVIDADE DE PAREDES CELULARES DE PLANTAS**

(30) Prioridade Unionista: 24/06/2005 EP 05 076488.5, 25/04/2006 EP 06 008463.9, 11/07/2005 US 60/698,182, 11/07/2005 US 60/698,182, 11/07/2005 US 60/698,182, 24/06/2005 EP 05 076488.5, 25/04/2006 EP 06 008463.9

(73) Titular(es): BAYER BIOSCIENCE N.V

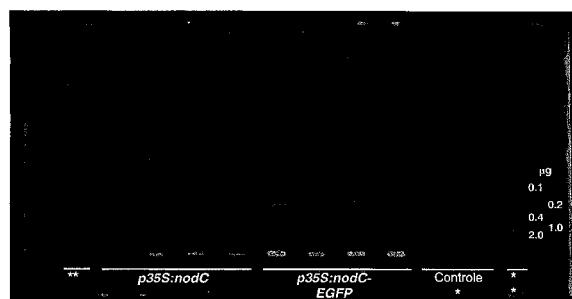
(72) Inventor(es): BERND ESSIGMANN, FRANK MEULEWAETER, MARC DE BLOCK, RAINHARD KOCH

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005853 de 19/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/136351 de 28/12/2006

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA ALTERAR A REATIVIDADE DE PAREDES CELULARES DE PLANTAS. A presente invenção refere-se a métodos e meios para a modificação da reatividade de paredes celulares de planta, particularmente, como podem ser encontradas em fibras naturais de plantas produtoras de fibra por inclusão de oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados na parede celular. Isto pode ser convenientemente obtido ao expressar um gene quimérico que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, particularmente uma N-acetilglicosamina transferase, capaz de ser marcada nas membranas do aparelho de Golgi em células de uma planta.





PI0613153-0

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS PARA ALTERAR A REATIVIDADE DE PAREDES CELULARES DE PLANTAS".**

A presente invenção refere-se à modificação da reatividade de  
paredes celulares de plantas, inclusive paredes celulares de plantas secundárias, particularmente conforme são encontradas em fibras naturais de plantas produtoras de fibras. Em particular, a presente invenção refere-se às fibras de algodão com reatividade alterada. A reatividade modificada poderia ser aplicada em métodos para tingir material derivado de planta dotada de  
parede celular tal como fibras naturais, utilizando corantes reativos à fibra, para aperfeiçoar, por exemplo, durabilidade de cor ou para reduzir os volumes de efluentes usados durante o processo de tingimento. A reatividade modificada também poderia ser aplicada para aperfeiçoar a reatividade das fibras naturais com reagentes tais como retardantes de chama, água, óleo e repelentes de sujeira, agentes antidobra, amaciantes, agentes antiestáticos, agentes de branqueamento fluorescente etc..

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

As fibras naturais, inclusive, fibras naturais dotadas de celulose de plantas, tais como, algodão e linho, vêm sendo usadas pela humanidade há mais de 5000 anos. As fibras dotadas de celulose natural, entretanto, não possuem a versatilidade química de fibras sintéticas, devido à natureza inerte relativa da celulose que consiste em monômeros de glicose  $\beta$ -1-4 ligados.

Esta natureza inerte relativa é, por exemplo, visível durante o processo de tingimento de fibras de algodão e tecidos. Geralmente dois tipos de corantes são usados para tingir algodão: corantes diretos e corantes reativos à fibra, sendo que ambos são moléculas aniônicas. O próprio algodão desenvolve uma carga aniônica em água, de modo que, sem tratamento especial, a absorção de corante pela fibra ou tecido seja bastante elaborada.

Os corantes diretos criam uma ligação de hidrogênio relativamente fraca com o polímero de celulose formando uma ligação semipermanente. Os corantes diretos são fáceis de se utilizar e menos dispendiosos do que os corantes reativos à fibra, porém não resistem bem à lavagem. Os

corantes reativos à fibra são moléculas que combinam cromóforos com um grupo reativo que forma fortes ligações covalentes com a fibra por meio da reação com grupos hidroxila. As ligações covalentes proporcionam uma boa resistência da fibra tingida à lavagem. A durabilidade de cor pode ser aperfeçoada utilizando fixadores catiônicos.

Durante o processo de tingimento, grandes quantidades de eletrólitos são necessárias para proteger os corantes aniônicos contra as cargas aniônicas da fibra. Os corantes não-reagidos (até 40%) precisam ser removidos através de uma etapa de lavagem conhecida como areamento, gerando grandes volumes de efluentes, que também contêm os eletrólitos mencionados acima.

Proporcionar a fibra de celulose com uma carga elétrica positiva, por exemplo, através da incorporação de compostos químicos positivamente carregados, poderia, portanto, aperfeiçoar a capacidade de coloração de fibras de celulose natural, bem como aperfeiçoar qualquer reação química da fibra de celulose modificada com compostos químicos negativamente carregados. Também poderia fazer uso de possíveis corantes acídicos.

Diversas publicações descreveram a incorporação ou revestimento de oligômeros de quitosana em fibras de celulose para fazer misturas de quitosana/celulose, fios ou tecidos. A quitosana é um polímero positivamente carregado de glicosamina, que pode ser obtida por desacetilação de quitina, por exemplo, por tratamentos alcalinos. A própria quitina é um polímero de N-acetilglicosamina ligada a  $\beta$ -1-4 (GlcNAc).

O pedido de patente U.S. US2003/0134120 descreve o revestimento de fibras naturais com quitosana.

Liu et al. (*Carbohydrate Polymers* 44(2003) 233-238) descreve um método para revestir fibras de algodão com quitosana, por oxidação do fio de algodão com periodato de potássio a 60°C em água e tratamento subsequente com uma solução de quitosana em ácido acético aquoso. Com o revestimento de quitosana, a superfície de fibra de algodão se torna fisiológica e biologicamente ativa. Uma vez que a reatividade química do grupo amina é maior do que o grupo hidroxila de monômeros de celulose, a fibra

possui mais potencial para modificação química adicional. Ademais, a superfície lisa da fibra de algodão se torna áspera, sugerindo um maior potencial para absorção de fármaco e liberação controlada desta.

Baseado na função fisiológica de quitosana para inibir, por exemplo, dermatófitos, diversas roupas, tecidos e fibras funcionais empregam fibras com mistura de celulose-quitosana, conjugados de fibra de celulose-quitosana e tecidos revestidos com resinas dotadas de quitosana.

WO 00/09729 descreve a expressão de quitina sintase e genes de quitina desacetilase em plantas para alterar a parede celular para usos industriais e resistência à doença aperfeiçoada. Os usos especificamente citados são: proporcionar uma única fonte de planta de celulose, quitina e quitosana, para aumentar a resistência à tração e aumentar a ruptura frágil. Os genes de quitina sintase especificamente sugeridos são derivados de organismos fungos. Nenhum dado experimental é proporcionado através da produção de quitina ou quitosana em plantas, nem através da incorporação desta em paredes celulares de plantas.

A técnica interior, assim, permanece deficiente no desenvolvimento de métodos para obter plantas das quais as paredes celulares de plantas, particularmente paredes de célula secundária, tais como, fibras naturais, podem ser isoladas contendo grupos químicos positivamente carregados e/ou grupos químicos que são mais reativos do que os grupos hidroxila de celulose. A técnica anterior também permanece deficiente no desenvolvimento de fibras que podem ser diretamente colhidas de plantas e que contêm grupos químicos positivamente carregados e/ou grupos que são mais reativos do que os grupos hidroxila de celulose, que podem ser diretamente usados sem a necessidade de tratamento químico adicional para introduzir tais grupos químicos. Estes e outros problemas são solucionados como descrito adiante nas diferentes modalidades, exemplos e reivindicações.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Brevemente, em uma modalidade, a invenção proporciona um método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos ou polissacarídeos

positivamente carregados na parede celular, particularmente na parede de célula secundária de uma célula da planta, que compreende introduzir um gene químico na célula da planta, por meio disto o gene químico compreende um promotor exprimível por planta ligado de forma operável a uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, de preferência, onde a N-acetilglicosamina transferase é marcada nas membranas do aparelho de Golgi; e uma terminação de transcrição e região de poliadenilação. Em uma modalidade particular, a planta é algodão, e os oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados são incorporados nas paredes de célula secundária que constituem a fibra de algodão.

Em outra modalidade da invenção, proporciona-se um método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados na parede celular, particularmente, a parede de célula secundária de uma célula de planta que compreende introduzir um gene quimérico na célula de planta, sendo que o gene quimérico compreende um promotor exprimível por planta ligado de forma operável a uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC; e uma terminação de transcrição e região de poliadenilação. Novamente, em uma modalidade específica, a planta é algodão, e os oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados são incorporados nas paredes de célula secundária que constituem a fibra de algodão.

Ainda em outra modalidade da invenção, proporciona-se um método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados na parede celular, particularmente, a parede de célula secundária de uma célula de planta, sendo que o método compreende

- i. introduzir um gene quimérico na célula de planta, sendo que o dito gene quimérico compreende os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

1. um promotor exprimível por planta;
  2. uma região de DNA que codifica quitina sintase; e
  3. uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.
- ii. aplicar à célula de planta transgênica uma quantidade eficaz

de N-acetilglicosamina, glicosamina-6-fosfato, N-acetilglicosamina-6-fosfato, N-acetilglicosamina-1-fosfato ou UDP-N-acetilglicosamina.

A invenção também proporciona paredes celulares de planta, que compreende uma quantidade aumentada de polissacarídeos ou oligossacarídeos, particularmente, oligossacarídeos positivamente carregados, tais como, oligo-N acetilglicosaminas ou oligo-glicosaminas, de preferência, oligômeros de N-acetilglicosamina ou glicosamina com um grau de polimerização entre 3 e 10, particularmente, entre 3 e 5. Tais paredes celulares de planta são obteníveis através dos métodos da invenção. Estas paredes celulares de planta podem ser submetidas à modificação química adicional.

Em uma modalidade específica, a invenção proporciona fibras de algodão que compreendem uma quantidade aumentada dos oligossacarídeos positivamente carregados mencionados aqui, e fios, tecidos que compreendem tais fibras de algodão. As fibras de algodão podem ser usadas como tais e podem ser submetidas à modificação química adicional, inclusive tingimento. Estas fibras de algodão podem ser identificadas, por exemplo, através de sua ligação aumentada de corantes aniônicos, inclusive vermelho congo, através de sua ligação aumentada de aglutinina de germe de trigo ou através de sua reatividade aumentada com corantes reativos à amina quando comparados com fibras de algodão obtidas a partir de plantas de algodão de uma linhagem isogênica que não contém um gene quimérico da N-acetilglicosamina transferase como descrito aqui. A presença e/ou a quantidade de oligossacarídeos nas fibras de algodão também pode ser diretamente determinada através de, por exemplo, cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).

Em outra modalidade, a invenção se refere ao uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase capaz de ser marcada no aparelho de Golgi de uma célula de planta para aumentar a quantidade de oligossacarídeos positivamente carregados na parede de célula de uma célula de planta ou para aumentar a reatividade de paredes celulares de planta para modificações químicas de tais paredes celulares de planta.

A invenção também proporciona genes quiméricos que compreendem as seguintes regiões de DNA ligadas de forma operável: um promotor exprimível por planta; uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, sendo que a dita N-acetilglicosamina transferase quando expressa em uma célula de planta, é marcada no aparelho de Golgi da dita célula de planta; e uma terminação de transcrição e região de poliadenilação. A N-acetilglicosamina transferase pode ser uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC ou também poderia ser uma quitina sintase, particularmente, uma quitina sintase que foi ligada de forma operável a um sinal de retenção de Golgi.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: alinhamento da sequência de aminoácido de proteínas NODC diferentes. Os resíduos de aminoácido conservados em todas as proteínas estão indicados em negrito. ROT\_NODC\_RHILP: proteína NODC de *Rhizobium leguminosarum* (biovar phaseoli); ROT\_NODC\_BRAJA: proteína NODC de *Bradyrhizobium japonicum* (SEQ ID No.); proteína NODC ROT\_NODC\_RHIS3 de *Rhizobium sp.* (cepa N33); ROT\_NODC\_RHISN: proteína NODC de *Rhizobium sp.*; ROT\_NODC\_RHILV: proteína NODC de *Rhizobium leguminosarum* (biovar viciae) e ROT\_NODC\_AZOCA: proteína NODC de *Azorhizobium caulinodans*.

Figura 2: alinhamento da sequência de aminoácido de proteínas NODC diferentes. Os resíduos de aminoácido conservados em todas as proteínas estão indicados em negrito. ROT\_NODC\_BRAJA: proteína NODC de *Bradyrhizobium japonicum* (SEQ ID No.); proteína NODC ROT\_NODC\_RHIS3 de *Rhizobium sp.* (cepa N33); ROT\_NODC\_RHISN: proteína NODC de *Rhizobium sp.*; ROT\_NODC\_RHILV: proteína NODC de *Rhizobium leguminosarum* (biovar viciae) e ROT\_NODC\_AZOCA: proteína NODC de *Azorhizobium caulinodans*.

Figura 3: fotografias de microscopia fluorescente realizada em células ciliadas radiculares de células pilosas que contêm o gene quimérico 35S::NodC.

Painel A. corte óptico de uma célula ciliada radicular maculada

com Calcoflúor; B: corte óptico de uma célula ciliada radicular maculada de forma imunoistoquímica na presença de N-acetilglicosamina; C: sobreposição dos cortes ópticos de painel A e painel B.

5 Figura 4: fotografias de microscopia fluorescente realizada sobre células ciliadas radiculares de células pilosas que contêm o gene quimérico 35S::NODC-EGFP.

Painel A: sobreposição dos cortes ópticos de painéis B, C e D. B: Corte óptico de uma célula ciliada radicular maculada com Calcoflúor; C: corte óptico de uma célula ciliada radicular para visualizar o aparelho de Golgi; D: corte óptico de uma célula ciliada radicular que visualiza a fluorescência através de EGFP.

10

Figura 5: fotografias de microscopia fluorescente realizada sobre células ciliadas radiculares de células pilosas que contêm o gene quimérico 35S::quitina sintase.

15 Painel A: corte óptico de uma raiz fasciculada cultivada na presença de 50 mM de N-acetilglicosamina, maculada na presença de N-acetilglicosamina; Painel B: corte óptico de uma raiz fasciculada cultivada sem a presença de nenhuma N-acetilglicosamina extra, maculada na presença de N-acetilglicosamina na parede celular.

20 Figura 6: cromatografia em camada fina de alta eficiência de quitooligômeros de material de parede celular isolado de raízes fasciculadas Arabidopsis.

As amostras das duas outras vias de acesso (1, 12) são soluções padrão de N-acetilglicosamina, quitobiase, quitotriose, quitotetraose e quitopentaose. Vias de acesso 2 a 5: material de parede celular extraído de culturas de raiz fasciculada iniciadas por *Agrobacterium rhizogenes* com um gene quimérico que compreende um promotor CaMV35S ligado a uma região codificadora nodC; vias de acesso 6 a 9: material de parede celular extraído das culturas de raiz fasciculada iniciadas por *Agrobacterium rhizogenes* com um gene quimérico que compreende um promotor CaMV35S ligado a uma região codificadora nodC unida a eGFP; vias de acesso 10 e 11, material de parede celular extraído das culturas de raiz fasciculada iniciadas por

25

30

*Agrobacterium rhizogenes* com um gene quimérico que compreende um promotor CaMV35S ligado a um região codificadora de fosfinotricina acetiltransferase. TLC foi realizada em acetonitrila (76): água (24): 0,5% de ácido bórico (10).

5                    Figura 7: HPTLC bidimensional sobre o material de parede celular isolado de raízes fasciculadas *Arabidopsis* que foi submetido à digestão de quitinase.

O material de parede celular de controle (painel esquerdo) foi extraído de culturas de raiz fasciculada iniciadas por *Agrobacterium rhizogenes* com um gene quimérico que compreende um promotor CaMV35S ligado a uma região codificadora de fosfinotricina acetiltransferase; o material de  
10                    parede celular experimental (painel direito) foi extraído de culturas de raiz fasciculada iniciadas por *Agrobacterium rhizogenes* com um gene quimérico que compreende um promotor CaMV35S ligado a uma região codificadora  
15                    nodC unida a eGFP. Os monômeros sacarídeos (N-acetilglicosamina) e dímeros quitossacarídeos (quitobiase) podem ser detectados no material experimental, porém não no material de controle. TLC foi realizada em acetonitrila (76): água (24): 0,5% de ácido bórico (10).

20                    Figura 8: HPTLC do material de parede celular isolado de plantas transgênicas *Arabidopsis*.

Via de acesso 1: solução padrão de quitooligosacarídeos; Lane 2 : 0,1 glicosamina; lanes 3 e 4: 4µl e 8µl, respectivamente de material de parede celular isolado de partes aéreas de *Arabidopsis* de controle; lanes 5 e 6: 4µl e 8µl, respectivamente de material de parede celular isolado de partes aéreas de *Arabidopsis* transgênica que compreendem um gene quimérico  
25                    CaMV35S::nodC; lanes 7 e 8 : 4µl e 8µl, respectivamente de material de parede celular isolado de partes aéreas de *Arabidopsis* transgênica que compreende um gene quimérico CaMV35S::nodC-eGFP. A linha pontilhada indica a quantidade aumentada de quitotriose particularmente em vias de  
30                    acesso 5 e 6.

Figura 9: microscopia de fluorescência de fibras de algodão reagidas com aglutinina de germe de trigo (WGA) conjugada com Alexa flúor

555.

Painel esquerdo: fibras de algodão de plantas de algodão transgênicas que contêm um gene CaMV35S::NodC. Painel direito: fibras de algodão de plantas de algodão de controle. Sob luz UV, uma fluorescência  
5 brilhante pode ser observada nas fibras das plantas de algodão transgênicas, indicando a presença de quitooligômeros nestas fibras.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES DIFERENTES DAS INVENÇÕES

A presente invenção se baseia na descoberta que a expressão  
10 de N-acetilglicosamina transferase do tipo *NODC* em células de planta resulta na incorporação de oligômeros de N-acetilglicosamina em paredes celulares de planta. Os oligômeros GlcNAc foram inesperadamente associados muito estreitamente com a parede celular e não foram dissolvidos a partir daquela parede celular através de diversos tratamentos. Surpreendentemente,  
15 te, a síntese dos oligômeros GlcNAc não requerem a adição externa de GlcNAc ao meio de crescimento, conforme foi observado com outras quitina sintases. Além disto e igualmente surpreendente, a proteína *NODC* também foi estreitamente associada com as membranas do aparelho de Golgi além da associação com a membrana celular conforme esperado. Quando a N-acetilglicosamina transferase do tipo *NODC* foi expressa em plantas de algodão,  
20 os oligômeros GlcNAc foram incorporados nas fibras de algodão, resultando em fibras de algodão mais reativas.

Desta maneira, em uma primeira modalidade da invenção, proporciona-se um método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos  
25 positivamente carregados na parede celular, particularmente, a parede de célula secundária de uma célula de planta, onde o método compreende a etapa de introduzir um gene quimérico na célula de planta, e o gene quimérico que compreende os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

- 30 - um promotor exprimível por planta
- uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, onde a N-acetilglicosamina transferase é do tipo *NODC*; e

- uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.

A proteína de nodulação C ("proteína NODC") e seu gene de codificação estão envolvidos na síntese dos sinais de lipoquitoligosacarádeo ou quitoligômeros acetilados (fatores Nod) que resultam na formação de nódulo típica da simbiose entre Rhizobiaceae e plantas leguminosas.

Os produtos de gene nod mais cruciais requeridos para a síntese destes lipoquitoligosacarádeos são NODA, NODB e NODC. Na ausência de outros produtos de gene nod estes podem formar um sinal de núcleo que consiste em oligômeros de quatro ou cinco resíduos de N-acetilglicosamina que transportam um grupo acila ligado por N. A função de cada uma destas proteínas na síntese de fatores de nodulação é bem-conhecida: NODC é uma N-acetilglicosaminil transferase que produz a cadeia quitoligosacarádeo; o grupo N-acetil do resíduo de N-acetilglicosamina de não-redução da cadeia quitoligosacarádeo é removido por NODB, que atua como uma quitina oligossacárido desacetilase; NODA está envolvida na ligação da cadeia acila ao grupo amina livre gerado pela ação de NODB. Outros fatores Nod, codificados por outros genes *nod*, proporcionam qualquer um dos grupos químicos que discriminam os diferentes fatores de nodulação. Para os propósitos da presente invenção, apenas as proteínas NODC e genes de codificação são relevantes.

A proteína NODC é uma proteína bem caracterizada (para análise veja Kamst and Spink, 1999, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 11, pp 187-199). Esta pertence a uma família de proteínas  $\beta$ -polissacárido sintase que estão envolvidas na síntese de polissacáridos lineares que contêm resíduos de monossacárido ligados por  $\beta$ . As enzimas que são de forma estrutural mais estreitamente relacionadas com NODC são transferases envolvidas na síntese de quitina (N-acetilglicosaminas ligadas por  $\beta$ -1-4); celulose (o polímero de resíduos de glucose ligados por  $\beta$ -1-4); ácido hialurônico (um copolímero de N-acetilglicosamina e ácido glucurônico) e oligossacáridos de quitina produzidos durante o desenvolvimento precoce de embriões de peixe-zebra. Seis regiões curtas conservadas entre estas proteínas podem ser identificadas. Para proteínas NODC, estas se-

qüências curtas correspondem a:

1) um resíduo K na posição 23 de SEQ ID No 1 (NODC de *Azorhizobium caulinodans*)]

2) a seqüência DDG na posição 86-88 de SEQ ID No 1

5 3) a seqüência VDSDT na posição 137-141 de SEQ ID No 1

4) a seqüência GPCAMYR na posição 207-213 de SEQ ID No 1

5) a seqüência GEDRHL na posição 237-242 de SEQ ID No 1; e

6) a seqüência QQLRW na posição 274-278 de SEQ ID No 1

Entretanto, é importante perceber que algumas proteínas NODC  
10 ou variantes destas podem ocorrer onde uma ou mais das seqüências consenso mencionadas acima não estão absolutamente conservadas.

As proteínas NODC também são freqüentemente caracterizadas por estiramentos hidrofóbicos de resíduos de aminoácido que representam domínios transmembranares (Barney et al. 1996, *Molecular Microbiology* 19, pp 443-453). O domínio hidrofóbico N-terminal atravessa a membrana bacteriana em uma orientação  $N_{out}-C_{in}$ , com o domínio hidrofóbico amplo adjacente que fica exposto ao citoplasma bacteriano. Esta orientação parece ser dependente da presença da(s) região(ões) hidrofóbica(s) próxima(s) à terminação C, que contém potencialmente três pares de membrana, de modo que  
20 a terminação C de NODC fique normalmente localizada no periplasma bacteriano.

A extensa alça hidrofílica de NODC também possui outra similaridade estrutural às regiões similares nas outras  $\beta$ -glicosil transferases. Esta região foi proposta para constituir um domínio A (que se estende de cerca de  
25 resíduo 45 a 140 na seqüência de SEQ ID No 4) que consiste em alternar folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices, e um domínio B (que corresponde a resíduos 215-280 de SEQ ID No 4) considerado o responsável pela processividade de NODC. No domínio A, dois resíduos separados são conservados (resíduos 88 e 139 de SEQ ID No. 4); no domínio B, um resíduo de aspartato e o motivo QX-  
30 XRW (resíduo 240 e 276-280 de SEQ ID No 4) também são conservados e considerados fundamentais para atividade catalítica.

Quando proteínas NODC diferentes forem comparadas com elas

mesmas, as seqüências de aminoácido que estão mais conservadas são reveladas. A Figura 1 representa um alinhamento de proteínas NODC diferentes de SEQ ID No 1, 2, 8, 4, 7, 5 e indica inúmeros resíduos conservados entre as proteínas NODC diferentes que incluem (em ordem):

- 5                   - a seqüência PXVDVIXPXXNE  
                   - a seqüência VDDGSXN  
                   - a seqüência GDXXLDVDSDTXXXXDV  
                   - a seqüência GXXMGQ  
                   - a seqüência DMEYWLACNEERXXQXRFGXVMXCXGXCM-

10    YR

- a seqüência FRTXYXPXAXATXVP  
                   - a seqüência YLXQQLRWARSTXRXTXL  
                   - a seqüência QNXGXXLL  
                   - a seqüência RFXFXXXHXXXNXXXLXPLKXYALXT

15               A Figura 2 representa um alinhamento de um subconjunto de proteínas NODC diferentes, que mostra resíduos ainda mais conservados, tais como:

                  - a seqüência WLTRLIDMEYWLACNEERXXQXRFGXVMCC-  
                   CGPCAMYRRS

20               - a seqüência LXXYEXQXFXGXPSXFGEDRHLTILMLXAGFRT-  
                   XYVPXAXATXVP

                  - a seqüência YLRQQLRWARSTXRDTXLA

25               O comprimento da cadeia principal de oligossacarídeo em oligossacarídeos de lipoquitina produzidos por Rhizobiaceae diferente varia entre dois e seis resíduos. Foi mostrado que a proteína de nodulação NODC é um determinante importante do comprimento de cadeia de oligossacarídeo de quitina na síntese da cadeia quitoooligossacarídeo (Kamst et al., 1997, *Journal of Bacteriology* 179, p 2103-2108).

30               As regiões codificadoras que codificam uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC podem ser diretamente obtidas a partir de bactérias que pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* ou *Sino-*

*rhizobium*. Entretanto, ficará imediatamente claro que tais regiões codificadas também podem ser feitas sinteticamente, mesmo com uso de códon adaptado à planta, particularmente a planta produtora de fibra na qual o gene quimérico que superexpressa a proteína tipo NODC é introduzido.

5                   As seqüências diferentes de proteínas NODC estão disponíveis junto aos bancos de dados tais como as seqüências de proteína identificadas pelos seguintes números de acesso: CAA67139, CAA608779, CAA51774, CAA51773, CAA25811, CAA25810, CAA25814, CAA68619, CAA2350, CAD31533, CAC05896, CAH04369, CAB56055, NP\_629203, 10 P26024, P17862, BAB524500, AAX30050, AAX30049, E38180, JQ0396, ZZZRC4, ZZZRCL, A95321, C23766, C26813, NP\_659761, NP\_443883, NP\_106714, NP\_768667, NP\_435719, BAC47292, AAU11365, AAU11364, AAU11363, AAU11362, AAU11361, AAU11360, AAU11359, AAU11358, AAU11357, AAU11356, AAU11355, AAU11354, AAU11353, AAU11352, 15 AAU11351, AAU11350, AAU114349, AAU11348, AAU11347, AAU11346, AAU11345, AAU11344, AAU11343, AAU11342, AAU11341, AAU11340, AAU11339, AAU11338, AAK65131, AAS91748, P04679\_2, P04679\_1, P04679, P72334, Q53513, P50357, P04678, P50536, P53417, Q07755, P04341, P04340, P24151, P04677, CAD90588, CAD90587, CAD90586, 20 CAD90585, CAD90584, CAD90583, CAD90257, CAD43933, AAM54775, AAN62903, S34305, S09522, S07304, AAL88670, CAD29957, CAD29956, CAD29955, CAD29954, CAD29953, CAD 29952, CAD29951, CAD29950, CAD29949, CAC42489, AAK53549, AAK53548, AAK50872, AAK39967, AAK39966, AAK39965, AAK39964, AAK39963, AAK39962, AAK39961, AAK39960, AAK39959, AAK39958, AAK39957, AAK39956, AAG44125, AAK00157, AAG60998, AAB71694, AAB16897, AAV80567, AAB95329, BAA24092, BAA06089, BAA06086, BAA06085, BAA06083, BAA06090, BAA06082, BAA06087, BAA06088, BAA06084, AAB91695, AAB51164, AAB47353, AAB34509, AAB24745, 1615305E, 1615305D, 165305C, CAA26311, CAA3731, AAA63602 ou 26226 (incorporados aqui à 30 guisa de referência).

Outras entradas nos bancos de dados UNIPROT que se referem

às proteínas NODC de comprimento total estão resumidas na Tabela 1. Todas as seqüências de aminoácido mencionadas referidas pelo número de acesso estão incorporadas aqui à guisa de referência.

Tabela 1: proteínas NODC de comprimento total

| UniProt/UniParc ID | Acesso UniProt         | Nome das Especies        | Comprimento |
|--------------------|------------------------|--------------------------|-------------|
| NODC_BRAJA         | <a href="#">P26024</a> | Bradyrhizobium japonicum | 485         |
| NODC_AZOCA         | <a href="#">Q07755</a> | Azorhizobium caulinodans | 395         |
| Q6PTX8_9RHIZ       | <a href="#">Q6PTX8</a> | Rhizobium sp. SIN-1      | 408         |
| Q70YC2_9BURK       | <a href="#">Q70YC2</a> | Cupriavidus taiwanensis  | 450         |
| Q6EX51_SINSB       | <a href="#">Q6EX51</a> | Sinorhizobium sp.        | 452         |
| NODC_RHIS3         | <a href="#">P72334</a> | Rhizobium sp.            | 450         |
| NODC_RHILP         | <a href="#">P24151</a> | Rhizobium leguminosarum  | 428         |
| Q8GNH5_RHIME       | <a href="#">Q8GNH5</a> | Rhizobium meliloti       | 421         |
| Q53254_RHITR       | <a href="#">Q53254</a> | Rhizobium tropici        | 452         |
| Q9AQ23_BRASW       | <a href="#">Q9AQ23</a> | Bradyrhizobium sp.       | 452         |
| NODC_RHISN         | <a href="#">P50357</a> | Rhizobium sp.            | 413         |
| Q8KLG3_RHIET       | <a href="#">Q8KLG3</a> | Rhizobium etli           | 443         |
| Q9RAN5_MESS7       | <a href="#">Q9RAN5</a> | Mesorhizobium sp.        | 416         |
| Q9Z316_BRASS       | <a href="#">Q9Z316</a> | Bradyrhizobium sp.       | 481         |
| NODC_RHILO         | <a href="#">P17862</a> | Rhizobium loti           | 424         |
| Q8KJI5_RHILO       | <a href="#">Q8KJI5</a> | Rhizobium loti           | 424         |
| NODC_RHIGA         | <a href="#">P50356</a> | Rhizobium galegae        | 433         |
| NODC_RHIME         | <a href="#">P04341</a> | Rhizobium meliloti       | 426         |
| Q9R614_RHIME       | <a href="#">Q9R614</a> | Rhizobium meliloti       | 424         |
| O52478_RHIME       | <a href="#">O52478</a> | Rhizobium meliloti       | 402         |
| Q52971_RHIME       | <a href="#">Q52971</a> | Rhizobium meliloti       | 402         |
| NODC_RHILV         | <a href="#">P04340</a> | Rhizobium leguminosarum  | 424         |

5

Entretanto, ficará evidente que variantes de proteínas NODC, onde um ou mais resíduos de aminoácido foram deletados, substituídos ou inseridos, que podem ser deduzidos a partir das seqüências de aminoácido

mencionadas acima, também podem ser usadas para atingir o mesmo efeito nos métodos de acordo com a invenção, ficando estabelecido que a atividade enzimática não foi alterada. Estas proteínas NODC variantes podem possuir cerca de 95% de identidade de sequência com qualquer uma das proteínas NODC mencionadas aqui. Um método para determinar atividade enzimática de proteínas NODC in vitro foi descrito, por exemplo, por Kamst et al., 1997 Journal of Bacteriology, 179, p2103-2108.

Desta maneira, como usado aqui, uma "N-acetilglicosamina transferase que é do tipo NODC" é uma N-acetilglicosamina transferase que catalisa a transferência da porção GlcNAc de UDP-GlcNAc até um oligossacarídeo de quitina nascente. De preferência, a proteína contém as regiões conservadas que podem ser encontradas ao comparar as diferentes proteínas NODC.

As proteínas particularmente adequadas para os métodos estão listadas na SEQ ID No 1 a SEQ ID No 9, particularmente a proteína listada na SEQ ID No 1, e os fragmentos de DNA que codificam tal proteína.

Foi observado (ver seção experimental) que as proteínas NODC quando expressas em células de plantas estão co-localizadas com as membranas do aparelho de Golgi, além da co-localização com o plasmalema. Para chegar na incorporação de quitooligossacarídeos na parede celular de planta, nenhuma alimentação com GlcNAc é requerida. Entretanto, quando as quitina sintases de origem fungosa forem usadas, estas proteínas não estão co-localizadas com as membranas do aparelho de Golgi, e alimentação com GlcNAc é requerida para chegar na incorporação significativa de quitooligossacarídeos nas paredes celulares. Sem a intenção de limitar a invenção a um modo particular de ação, acredita-se que os domínios de transposição de transmembrana de proteínas NODC podem ser mais apropriados para inserção nas membranas do aparelho de Golgi do que aqueles do plasmalema e que a localização destas proteínas envolve a necessidade de alimentação externa com GlcNAc. A modificação de proteínas quitina sintase, tal como uma quitina sintase de origem fungosa, por exemplo, uma quitina sintase de *Neurospora crassa*, para relocalizar as quitina sintases

nas membranas do aparelho de Golgi é suficiente para abolir a necessidade de alimentação externa com GlcNAc. Tal realocização foi obtida ao ligar a proteína quitina sintase a um peptídeo âncora sinal que marca a proteína ligada em membranas do aparelho de Golgi.

5                    Desta maneira, em outra modalidade da invenção, proporciona-se um método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos positivamente carregados na parede celular, particularmente a parede de célula secundária de uma célula de planta, que compreende a etapa de introduzir um gene quimérico na célula de planta, sendo que o dito gene quimérico com-  
10        preende

- um promotor exprimível por planta
- uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, onde a N-acetilglicosamina transferase é marcada nas membranas do aparelho de Golgi; e

15                    - uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.

                    Como usado aqui, a N-acetilglicosamina transferase não se limita às proteínas tipo NODC, porém também inclui quitina sintases (Quitina UDP-acetil-glicosaminil transferases), tais como as quitina sintases de origem fungosa. Exemplos de seqüências de aminoácido de tais quitina sintases podem ser encontrados nos diferentes bancos de dados que incluem as  
20        seqüências de aminoácido com os seguintes identificadores (números de acesso): CHS1\_AJECA (P30576) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 1 de Classe-I) de *Ajellomyces capsulata* (*Histoplasma capsulatum*); CHS1\_AJEDE (P30579) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1)  
25        (quitina sintase 1 de Classe-I) de *Ajellomyces dermatitidis* (*Blastomyces dermatitidis*); CHS1\_ASPNG (P30581) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 1 de Classe-I) de *Aspergillus niger*; CHS1\_BOTCI (P49603) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16)  
30        (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 1 de Classe-I) de *Botrytis cinerea* (fungo da podridão nobre) (*Botryotinia fuckeliana*); CHS1\_CANAL (P23316) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-

- glicosaminil transferase 1) de *Candida albicans* (Levedura); CHS1\_CRYNV (O13356) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 1 de Classe-IV). {GENE: Nome=CHS1} - *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (*Filobasidiella neoformans* var. *grubii*);
- 5 CHS1\_EMENI (P30583) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 1 de Classe-I) (Fragmento). {GENE: Nome=chs1} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHS1\_EXODE (P30600) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 1 de Classe-II). {GENE: Nome=CHS1} - *Exophiala dermatitidis* (*Wangiella dermatitidis*);
- 10 CHS1\_EXOJE (P30585) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Quitina sintase 1 de Classe-I) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Exophiala jeanselmei*; CHS1\_NEUCR (P29070) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (quitina sintase 3 de Classe-III). {GENE: Nome=chs-1; ORFNomes=B11H24.170, NCU03611.1} - *Neurospora crassa*; CHS1\_PHAEX (P30590); Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Phaeococcomyces exophialae*; CHS1\_PHYBL (P87073) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Quitina sintase 1 de Classe-II). {GENE: Nome=chs1} - *Phycomyces blakesleeanus*; CHS1\_RHIAT (P30592) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Quitina sintase 1 de Classe-I) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Rhinocladiella atrovirens*; CHS1\_RHIOL (P30594) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1). {GENE: Nome=CHS1} - *Rhizopus oligosporus*;
- 25 CHS1\_RHIRA (Q12632) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Quitina sintase 1 de Classe-II). {GENE: Nome=CHS1} - *Rhizomucor racemosus* (*Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*); CHS1\_SCHCO (P30596); Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Schizophyllum commune* (fungo Bracket); CHS1\_SCHPO (P30597) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1). {GENE: No-
- 30

me=chs1; ORFNomes=SPAC13G6.12c, SPAC24B11.01c} - *Schizosaccharomyces pombe* (levedura de fissão); CHS1\_TUBUN (P55003) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Tuber uncinatum* (Burgundy truffle);

5 CHS1\_USTMA (P30598) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Ustilago maydis* (fungo Smut); CHS1\_XYLBA (P30603) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS1} - *Xylohypha bantiana*; CHS1\_YEAST (P08004) Quitina

10 sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1). {GENE: Nome=CHS1; *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de Baker); CHS2\_AJECA (P30577) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-III) *Ajellomyces capsulata* (*Histoplasma capsulatum*); CHS2\_AJEDE (P30580) Quitina sintase 2

15 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-II) {GENE: Nome=CHS2} - *Ajellomyces dermatitidis* (*Blastomyces dermatitidis*) CHS2\_ASPNG (P30582); Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-II) (Fragmento). {GENE: Nome=chs2} - *Aspergillus niger*; CHS2\_CANAL

20 (P30572) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2). {GENE: Nome=CHS2} - *Candida albicans* (Levedura); CHS2\_EXODE (P30601) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-I). {GENE: Nome=CHS2} - *Exophiala dermatitidis* (*Wangiella dermatitidis*); CHS2\_EXOJE

25 (P30586) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS2} - *Exophiala jeanselmei*; CHS2\_NEUCR (P30589) ; Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2). {GENE: Nome=chs-2; ORFNomes=NCU05239.1} - *Neurospora crassa* ; CHS2\_PARBR (Q92444) Quitina

30 sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-II). {GENE: Nome=CHS2} - *Paracoccidioides brasiliensis*; CHS2\_PHAEX (P30591); Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-

- UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-II) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS2} - *Phaeococcomyces exophialae*; CHS2\_RHIAT (P30593) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-III) (Fragmento).
- 5 {GENE: Nome=CHS2} - *Rhinocladiella atrovirens*; CHS2\_RHIOL (P30595) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2). {GENE: Nome=CHS2} - *Rhizopus oligosporus*; CHS2\_SCHPO (O74756) proteína 2 tipo quitina sintase. {GENE: Nome=chs2; ORF Nomes=SPBC1709.01, SPBC1734.17} - *Schizosaccharomyces pombe* (levedura de fissão); CHS2\_USTMA (P30599) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS2} - *Ustilago maydis* (fungo Smut); CHS2\_XYLBA (P30604) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2) (quitina sintase 2 de Classe-II) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS2} - *Xylohypha bantiana* ; CHS2\_YEAST (P14180); Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2). {GENE: Nome=CHS2; OrderedLocusNomes=YBR038W; ORF Nomes=YBR0407} - *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de Baker); CHS3\_AJECA (P30578) Quitina sintase 3 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 3) (quitina sintase 3 de Classe-II) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS3} - *Ajellomyces capsulata* (*Histoplasma capsulatum*); CHS3\_CANAL (P30573) Quitina sintase 3 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 3) (quitina sintase 3 de Classe-IV). {GENE: Nome=CHS3} - *Candida albicans* (Levedura); CHS3\_EXODE (P30602) Quitina sintase 3 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 3) (quitina sintase 3 de Classe-III). {GENE: Nome=CHS3} - *Exophiala dermatitidis* (*Wangiella dermatitidis*); CHS3\_EXOJE (P30587); Quitina sintase 3 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 3) (quitina sintase 3 de Classe-III) (Fragmento). {GENE: Nome=CHS3} - *Exophiala jeanselmei*; CHS3\_NEUCR (P30588) Quitina sintase 3 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 3). {GENE: Nome=chs-3; ORFNomes=G65A3.040} - *Neurospora crassa*; CHS3\_YEAST (P29465) Quitina sintase 3 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 3) (quitina
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

- sintase 3 de Classe-IV). {GENE: Nome=CHS3; Sinônimos=CAL1, CSD2, DIT101, KIT2; Ordered Locus Nomes=YBR023C; ORFNomes=YBR0305} - *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de Baker); CHS4\_MAGGR (O13353); Quitina sintase 4 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 4) (quitina sintase 4 de Classe-IV). {GENE: Nome=CHS4} - *Magnaporthe grisea* (fungo Rice blast) (*Pyricularia grisea*); CHS4\_NEUCR (Q01285) Quitina sintase 4 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 4) (quitina sintase 4 de Classe-IV). {GENE: Nome=chs-4; ORFNomes=NCU09324.1} - *Neurospora crassa*; CHS5\_USTMA (O13394) Quitina sintase 5 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 5) (quitina sintase 5 de Classe-IV). {GENE: Nome=CHS5} - *Ustilago maydis* (Smut fungus); CHS6\_USTMA (O13395) Quitina sintase 6 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 6) (quitina sintase 6 de Classe-V). {GENE: Nome=CHS6} - *Ustilago maydis* (Smut fungus); CHSA\_AMPQU (Q12564); Quitina sintase A (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase A) (quitina sintase A de Classe-I). {GENE: Nome=CHSA} - *Ampeleomyces quisqualis*; CHSA\_EMENI (P30584) Quitina sintase A (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase A) (quitina sintase A de Classe-II). {GENE: Nome=chsA; Synonyms=chs2} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHSB\_EMENI (Q00757) Quitina sintase B (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase B) (quitina sintase B de Classe-III). {GENE: Nome=chsB} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHSC\_ASPFU (Q92197) Quitina sintase C (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase C) (quitina sintase C de Classe-III). {GENE: Nome=chsC} - *Aspergillus fumigatus* (*Sartorya fumigata*); CHSD\_ASPFU (P78746) Quitina sintase D (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase D) (quitina sintase D de Classe-VI). {GENE: Nome=chsD} - *Aspergillus fumigatus* (*Sartorya fumigata*); CHSD\_EMENI (P78611) Quitina sintase D (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase D) (quitina sintase D de Classe-V). {GENE: Nome=chsD; Sinônimos=chsE} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHSG\_ASPFU (P54267); Quitina sintase G (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase G) (quitina sintase

G de Classe-III). {GENE: Nome=chsG} - *Aspergillus fumigatus* (Sartorya fumigata); CHSX\_USTMA (Q99126) Quitina sintase 1 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 1). {GENE: Nome=CHS1} - *Ustilago maydis* (fungo Smut); CHSY\_USTMA (Q99127) Quitina sintase 2 (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase 2). {GENE: Nome=CHS2} - *Ustilago maydis* (Smut fungus) ou CHS\_SAPMO (P48017) Quitina sintase (EC 2.4.1.16) (Quitina-UDP acetil-glicosaminil transferase). {GENE: Nome=CHS} - *Saprolegnia monoica*. Todas as seqüências estão incorporadas aqui à guisa de referência.

10                   As quitina sintases deveriam ser, de preferência, equipadas com seqüências âncora sinal (heterólogas) que marcam a quitina sintase nas membranas do aparelho de Golgi. Tais seqüências são conhecidas na técnica, incluindo as seqüências dentro e adjacentes ao segmento de transmembrana de  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase (particularmente, os primeiros 44 ou 52 aminoácidos destas; Munro et al. 1991, EMBO Journal, 10: 3577-3588); a seqüência âncora sinal de galactosil transferase humana (particularmente, os primeiros 60 aminoácidos destas) ou a seqüência âncora sinal do homólogo *Arabidopsis* do receptor (AtERD2) de levedura HDEL (Saint-Jore et al., 2002, The Plant Journal, 29: 661-678), a seqüência âncora sinal de proteína  $\beta$ 1,2-xilosiltransferase (particularmente, os primeiros 36 aminoácidos desta; Pagny et al., 2003, The Plant Journal 33: 189-203) ou as seqüências âncora sinal de N-acetil-glicosaminil transferase I (particularmente, os primeiros 77 aminoácidos destas; Essl et al. 1999, FEBS Lett. 453:169-173) (toda a publicação está incorporada aqui à guisa de referência). Outros sinais de marcação de Golgi que serão empregados por fusão na terminação C da N-acetilglicosamina transferase incluem a seqüência de aminoácido "YYHDL" como pode ser encontrado na proteína DAGAT1 *Arabidopsis* ou "LKLEI" como pode ser encontrado em DAGAT2 *Arabidopsis*. A fusão de tais seqüências âncora sinal com quitina sintases ao ligar fragmentos de DNA que codificam os respectivos polipeptídeos pode ser obtida utilizando técnicas DNA recombinante padrão. N-acetilglicosamina transferases do tipo NODC também pode ser ligada de forma operável a seqüências âncora sinal que

marcam o aparelho de Golgi.

Em outra modalidade da invenção, proporciona-se um método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos positivamente carregados na parede celular, particularmente a parede de célula secundária de uma célula de planta, que compreende a etapa de introduzir um gene quimérico na célula de planta, onde o gene quimérico compreende os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável

- um promotor exprimível por planta;
- uma região de DNA que codifica quitina sintase (quitina UDP-acetilglucosamine transferase), de preferência, de origem fungosa; e
- uma terminação de transcrição e região de poliadenilação

e compreende adicionalmente a etapa de aplicar uma quantidade eficaz de N-acetilglicosamina ou N-acetilglicosamina-1-fosfato ou N-acetilglicosamina-6-fosfato ou glicosamina-6-fosfato à célula de planta ou à planta.

- Os genes quiméricos de acordo com a invenção compreendem um promotor exprimível por planta. Como usado aqui, o termo "promotor" se refere a qualquer DNA que é reconhecido e ligado (direta ou indiretamente) através de um RNA-polimerase dependente de DNA durante o início de transcrição. Um promotor inclui o sítio de início de transcrição, e sítios de ligação para fatores de início de transcrição e RNA polimerase, e pode compreender diversos outros sítios (por exemplo, intensificadores), onde as proteínas reguladoras de expressão podem se ligar.

- Como usado aqui, o termo "promotor exprimível por planta" se refere a uma sequência de DNA que é capaz de controlar (iniciar) a transcrição em uma célula de planta. Esta inclui qualquer promotor de origem de planta, porém também qualquer promotor de origem de não-planta que é capaz de conduzir a transcrição em uma célula de planta, ou seja, certos promotores de origem viral ou bacteriana, tais como, CaMV35S, o promotor de vírus trevo-subterrâneo No 4 ou No 7, ou promotores de gene T-DNA e similares.

Um promotor exprimível por planta que controla o início e manutenção de transcrição, de preferência, em células de fibras é um promotor

que conduz a transcrição da região de DNA ligada de forma operável até um nível maior em células de fibras e nas células da epiderme subjacentes do que em outras células ou tecidos da planta. Tais promotores incluem o promotor de algodão a partir de um gene da tubulina- $\beta$  específico de fibra (como descrito em WO0210377), o promotor de algodão de um gene actina específico de fibra (como descrito em WO0210413), o promotor de um gene de proteína de transferência de lipídeo específico de fibra de algodão (como descrito em US5792933), um promotor de um gene expansina de algodão (WO9830698) ou um promotor de um gene quitinase em algodão (US2003106097) ou os promotores dos genes específicos de fibra descritos em US6259003 ou US6166294.

A invenção proporciona adicionalmente paredes celulares de planta, que compreendem fibras que incluem tais paredes celulares obtidas de células de plantas que utilizam os métodos de acordo com a invenção. Tais paredes celulares de planta compreendem oligo ou polissacarídeos positivamente carregados, tais como oligômeros de N-acetilglicosamina ou quitina, embutidos na celulose. Estas paredes celulares de planta podem ser adicionalmente modificadas, por exemplo, parcial ou completamente desacetiladas de modo que os oligômeros que compreendem resíduos de glicosamina sejam obtidos. O grupo amina das glicosaminas resultantes é quimicamente mais reativo do que o grupo aminoacetil de N-acetilglicosamina ou o grupo hidroxila de celulose.

A parede celular de planta obtida de acordo com a invenção, particularmente aquelas que foram submetidas a uma etapa de desacetilação, pode ser, de forma adicional, quimicamente modificada. Os produtos que contêm tais paredes celulares de planta, tais como fibras, fios ou tecidos possuem qualidades que parecem aquelas das misturas de celulose-quitosana descritas na técnica, inclusive durabilidade de cor aperfeiçoada, inibição aperfeiçoada, por exemplo, de dermatófitos, liberação de fármaco controlada etc.

Em uma modalidade específica, a invenção proporciona fibras de algodão obtidas de ou que podem ser obtidas de plantas de algodão de

acordo com os métodos da invenção. Em outras palavras, as fibras de algodão são proporcionadas de plantas de algodão que compreendem no genoma, tal como o genoma nuclear, de suas células um gene quimérico que compreende um promotor exprimível por planta ligado de forma operável a uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, onde a N-acetilglicosamina transferase é marcada nas membranas do aparelho de Golgi ou as fibras de algodão são proporcionadas de plantas de algodão que compreendem no genoma, tal como o genoma nuclear, de suas células um gene quimérico que compreende um promotor exprimível por planta ligado de forma operável a uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC, ou as fibras de algodão são proporcionadas de plantas de algodão que compreendem no genoma, tal como o genoma nuclear, de suas células um gene quimérico que compreende um promotor exprimível por planta ligado de forma operável a uma região de DNA que codifica uma quitina sintase. Particularmente, no último caso, pode ser vantajoso aplicar nas células de planta ou plantas uma quantidade eficaz de N-acetilglicosamina ou N-acetilglicosamina-1-fosfato ou N-acetilglicosamina-6-fosfato ou glicosamina-6-fosfato. As modalidades particulares de regiões codificadoras de DNA ou promotores compreendidos nos genes quiméricos transferidos em plantas de algodão são conforme descrito em outro lugar neste documento.

As fibras de algodão de acordo com a invenção podem ser distinguidas de fibras naturalmente ocorrentes, ou seja, fibras de algodão obtidas de uma linhagem isogênica que não compreende um gene quimérico de acordo com a invenção, através da capacidade de tais fibras com coloração aumentada com corantes aniônicos (inclusive, por exemplo, Vermelho Congo), através da capacidade de tais fibras com coloração aumentada com corantes reativos à amina (inclusive, por exemplo, tetrafluorofenil éster). As fibras de algodão de acordo com a invenção também possuem a capacidade de ligação de aglutinina de germe de trigo que liga quitooligômeros. As fibras de algodão de acordo com a invenção também podem ser distinguidas de fibras naturalmente ocorrentes por detecção direta dos oligômeros de N-

acetilglicosamina e GlcNAc, tal como quitobiase, de preferência, após o tratamento do material de parede celular de fibra com quitinase. As fibras de algodão de acordo com a invenção também podem ser distinguidas por seu teor de nitrogênio aumentado.

5                   As fibras de algodão de acordo com a invenção também podem ser distinguidas das fibras revestidas com quitosana ou de fios misturados com quitosana/celulose, já que os oligômeros positivamente carregados são mais ou menos uniformemente distribuídos nas paredes celulares de planta secundária que constituem as fibras. Conseqüentemente, em cortes microscópicos de fibras de algodão, maculadas, por exemplo, com WGA ou com  
10                   vermelho congo ou com tetrafluorofenila como descrito a seguir, os corantes serão distribuídos mais ou menos uniformemente por todas as paredes celulares que constituem as fibras de algodão, enquanto que em fibras revestidas com quitosana, a coloração ficará concentrada na camada de quitosana  
15                   localizada como uma folha na superfície das fibras tratadas.

                  As fibras de algodão de acordo com a invenção também podem ser distinguidas de outras fibras de algodão por detecção da N-acetilglicosamina transferase que compreende genes quiméricos em ácidos  
nucléicos que permanecem no material de planta associado com fibras de  
20                   algodão.

                  A coloração aumentada do material de parede celular de planta de acordo com a invenção, através de corantes aniônicos tal como vermelho-congo pode ser quantificada, por exemplo, ao tingir uma quantidade uniforme de material sob condições padrão, ao distribuir o material sobre uma  
25                   área padronizada (tal como uma cavidade em uma placa com múltiplas cavidades) digitalizando uma foto da área na escala de cinza da camada tingida de material. Quanto menos cinza, mais tingido ficará o material de parede celular de planta. Desta maneira, as fibras de algodão e material de parede celular de acordo com a invenção mostraram um aumento de pelo menos  
30                   cerca de 5% na coloração por vermelho-congo comparado com o material de parede celular de controle ou fibras de linhagens isogênicas de planta sem um gene codificador de N-acetilglicosamina transferase.

A capacidade de as novas fibras de algodão ligarem especificamente aglutinina de germe de trigo (detectável pelo grupo fluorofórico acoplado) é uma característica de diferenciação visível das novas fibras de algodão proporcionadas através das fibras de algodão naturalmente ocorrentes. Ex-

5 ceto em uma fluorescência de fundo muito baixa, as fibras naturalmente ocorrentes não maculam/produzem fluorescência quando tratadas com WGA-alexa flúor 488 ou 555. A fluorescência de fibras de algodão aumenta no mínimo 5 vezes quando quitoooligômeros estiverem presentes. Consequentemente, a invenção proporciona fibras de algodão que são capazes de ligar

10 especificamente aglutinina de germe de trigo, ou WGA acoplado a um fluoróforo, tal como WGA Alexa 488 ou WGA Alexa 555 ou que, quando tratadas com WGA Alexa 488 ou WGA Alexa 555 proporcionam uma fluorescência brilhante sob luz UV. Esta fluorescência não se restringe à superfície da fibra de algodão, porém é distribuída por toda a parede celular das células de fi-

15 bra.

O material de parede celular de planta de acordo com a invenção, que inclui fibras de algodão possui tipicamente quitoooligosacarídeos em uma concentração de pelo menos 0,1 µg/mg de material de parede celular, de preferência, pelo menos 1 µg/mg de material de parede celular, de preferência, pelo menos 5 µg/mg de material de parede celular.

20

A invenção também proporciona os genes quiméricos conforme descrito aqui, e células de planta ou plantas que contêm tais genes quiméricos.

Quando os métodos da invenção se referirem à introdução de um gene quimérico em uma célula de planta, ficará claro que tais métodos

25 também podem ser aplicados em casos onde a célula de planta está incorporada em uma planta madura. Por exemplo, as células transgênicas podem ser regeneradas em plantas transgênicas de acordo com métodos estabelecidos.

Os métodos para transformar células de plantas e plantas são bem-conhecidos na técnica. Os métodos para transformar plantas de algodão também são bem-conhecidos na técnica. A transformação mediada por

30

agrobacterium de algodão foi descrita, por exemplo, na patente U.S. 5.004.863 ou na patente U.S. 6.483.013 e a transformação de algodão por bombardeio de partículas está divulgada, por exemplo, em WO 92/15675.

Os genes quiméricos podem ser introduzidos por transformação  
 5 em plantas de algodão das quais calos embriogênicos podem ser derivados, tais como, Coker 312, Coker310, Coker 5Acala SJ-5, GSC25110, FiberMax 819 , Siokra 1-3, T25, GSA75, Acala SJ2, Acala SJ4, Acala SJ5, Acala SJ-C1, Acala B1644, Acala B1654-26, Acala B1654-43, Acala B3991, Acala GC356, Acala GC510, Acala GAM1, Acala C1, Acala Royale, Acala Maxxa,  
 10 Acala Prema, Acala B638, Acala B1810, Acala B2724, Acala B4894, Acala B5002, non Acala "picker" Siokra, variedade de "extrator" FC2017, Coker 315, STONEVILLE 506, STONEVILLE 825, DP50, DP61, DP90, DP77, DES119, McN235, HBX87, HBX191, HBX107, FC 3027, CHEMBRED A1, CHEMBRED A2, CHEMBRED A3, CHEMBRED A4, CHEMBRED B1,  
 15 CHEMBRED B2, CHEMBRED B3, CHEMBRED C1, CHEMBRED C2, CHEMBRED C3, CHEMBRED C4, PAYMASTER 145, HS26, HS46, SICALLA, PIMA S6 and ORO BLANCO PIMA, Fibermax® FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, FM966 and FM958, FM989, FM958, FM832, FM991, FM819, FM800, FM960, FM966, FM981, FM5035, FM5044,  
 20 FM5045, FM5013, FM5015, FM5017 ou FM5024 e plantas com genótipos derivados destes.

"Algodão" como usado aqui inclui *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* e *Gossypium herbaceum* ou progênie de cruzamentos entre tais espécies.

25 Os métodos e meios da presente invenção também podem ser empregados em outras espécies de plantas, tais como, cânhamo, juta, linho e plantas lenhosas, inclusive, porém sem caráter limitativo, *Pinus spp.*, *Populus spp.*, *Picea spp.*, *Eucalyptus spp.* etc.

A planta transformada obtida pode ser usada em um esquema  
 30 de cultivo convencional para produzir mais plantas transformadas com as mesmas características ou para introduzir os genes quiméricos de acordo com a invenção em outras variedades das mesmas espécies de planta ou

espécies relacionadas, ou em plantas híbridas. As sementes obtidas das plantas transformadas contêm os genes quiméricos da invenção como um inserto genômico estável e também são abrangidas pela invenção.

Como usado aqui, "compreende" deve ser interpretado para especificar a presença das características, números inteiros, etapas ou componentes estabelecidos como referido, porém não exclui a presença ou adição de uma ou mais características, números inteiros, etapas ou componentes, ou grupos destes. Desta maneira, por exemplo, um ácido nucléico ou proteína que compreende uma sequência de nucleotídeos ou aminoácidos pode compreender mais nucleotídeos ou aminoácidos do que aqueles realmente citados, ou seja, abrangidos em um ácido nucléico ou proteína maior. Um gene quimérico que compreende uma região de DNA, que é definido de forma funcional ou estrutural, pode compreender regiões de DNA adicionais etc.

Os seguintes Exemplos não-limitativos descrevem os métodos para alterar as paredes celulares de planta. Salvo determinação em contrário nos Exemplos, todas as técnicas de DNA recombinante são realizadas de acordo com os protocolos padrão como descrito em Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY and in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Os materiais e métodos padrão para trabalho molecular em plantas estão descritos em *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, juntamente publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) e Blackwell Scientific Publications, UK.

Durante a descrição e Exemplos, faz-se referência às seguintes seqüências representadas na listagem de seqüência:

SEQ ID No 1: Proteína de nodulação C de *Azorhizobium caulinodans*

SEQ ID No 2: Proteína de nodulação C de *Bradyrhizobium japonicum*

SEQ ID No 3: Proteína de nodulação C de *Rhizobium galegae*

SEQ ID No 4: Proteína de nodulação C de *Rhizobium leguminosarum* (biovar *viciae*)

SEQ ID No 5: Proteína de nodulação C de *Rhizobium meliloti*

SEQ ID No 6: Proteína de nodulação C de *Rhizobium tropici*

5 SEQ ID No 7: Proteína de nodulação C de *Rhizobium leguminosarum* (biovar *phaseoli*)

SEQ ID No 8: Proteína de nodulação de *Rhizobium* sp. Cepa N33

SEQ ID No 9: Proteína de nodulação de *Rhizobium loti*

10 SEQ ID No 10: T-DNA de pTGK42

SEQ ID No 11: T-DNA de pTGK44

SEQ ID No 12: T-DNA de pTDBI5

SEQ ID No 13: T-DNA de pTDBI37

SEQ ID No 14: T-DNA de pTDBI50

15 SEQ ID No 15: Quitina sintase sintética ligada a sinal de marcação de Golgi.

## EXEMPLOS

Exemplo 1: Construção de genes quiméricos exprimíveis por planta que codificam uma proteína N-acetilglicosamina transferase.

20 Ao utilizar técnicas de DNA recombinante padrão, um gene quimérico de NODC esprimível por planta foi construído contendo os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

• uma região de promotor 35S de CaMV  
• um fragmento de DNA que codifica uma sequência líder não-traduzida (5'Cab22L)

25

• um fragmento de DNA que codifica NODC de *Azorhizobium caulinodans*

• um fragmento de DNA de EGFP (proteína verde fluorescente aumentada) clonado em construção com ORF de codificação de NODC, de modo que uma proteína de fusão seja formada compreendendo NODC e EGFP

30

• uma terminação de transcrição e sinal de poliadenilação da

transcrição 35S de CaMV (3' 35S)

O gene quimérico foi introduzido entre as margens de T-DNA de um vetor de T-DNA juntamente com um gene *bar* quimérico que proporciona resistência à fosfinotricina. O vetor de T-DNA resultante foi nomeado pTGK44. A seqüência do T-DNA deste vetor é proporcionada na SEQ ID No 11. Este vetor de T-DNA permitiu a análise histoquímica da localização da proteína de fusão NODC-EGFP.

Outro gene quimérico foi construído contendo os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

- uma região de promotor 35S de CaMV
- um fragmento de DNA que codifica uma seqüência líder não-traduzida (5'Cab22L)
- um fragmento de DNA que codifica NODC de *Azorhizobium caulinodans*
- uma terminação de transcrição e sinal de poliadenilação da transcrição 35S de CaMV (3' 35S)

O gene quimérico foi introduzido entre as margens de T-DNA de um vetor de T-DNA juntamente com um gene *bar* quimérico que proporciona resistência à fosfinotricina. O vetor de T-DNA resultante foi nomeado pTGK42. A seqüência do T-DNA deste vetor é proporcionada na SEQ ID Nº 10. Este vetor de T-DNA permitiu expressar NODC em células de plantas, analisar se quitooligossacarídeos foram produzidos associados à parede celular de tais células de plantas.

Um gene quimérico de controle que codifica uma N-acetilglicosamina transferase que é diferente da proteína do tipo NODC também foi construído contendo os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

- uma região de promotor 35S de CaMV
- um fragmento de DNA que codifica uma seqüência líder não-traduzida (5'Cab22L)
- um fragmento de DNA que codifica quitina sintase de *Neurospora crassa*

- uma terminação de transcrição e sinal de poliadenilação da transcrição 35S de CaMV (3' 35S)

O gene quimérico foi introduzido entre as margens de T-DNA de um vetor de T-DNA juntamente com um gene *bar* quimérico que proporciona resistência à fosfinotricina. O vetor de T-DNA resultante foi nomeado pTGK43. A sequência do T-DNA deste vetor é proporcionada na SEQ ID No 12. Este vetor de T-DNA permitiu expressar quitina sintase em células de plantas, analisar se quitooligossacarídeos foram produzidos associados à parede celular de tais células de plantas.

Os vetores de T-DNA foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif(pEHA101). Para experimentos de controle, um vetor de T-DNA que contém apenas um gene *bar* quimérico foi introduzido na mesma cepa de *Agrobacterium*.

As cepas de *A. tumefaciens* foram subsequentemente usadas para gerar culturas de raiz fasciculada de *Arabidopsis thaliana* por co-transformação de discos foliares com *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 e as cepas de *A. tumefaciens* que transportam os diferentes vetores de T-DNA de acordo com o seguinte protocolo.

Os seguintes meios foram usados:

meio de germinação: sais MS/2, vitaminas B5, 1,5% de sacarose, pH 5,8, 0,7% de ágar (Difco)

meio padrão: meio MS, 0,5 g/L de MES, 2% de glucose, pH 5,8, 0,7% de ágar (Difco)

meio de indução de calo: meio MS, 0,5 g/L de MES, 2% de glucose, pH 5,8, 0,7% de ágar (Difco), 0,2 mg/L 2,4D e 0,2 mg/L de quinetina

meio de prolongamento de raiz fasciculada: meio MS, 2% de sacarose, pH 6,2, 0,7% de ágar (Difco)

meio de cultura de raiz: meio B5, 3% de sacarose, pH 5,5.

As partes aéreas de *Arabidopsis* in vitro foram cultivadas a partir de sementes esterilizadas da seguinte maneira.

As sementes foram tratadas durante 2 minutos com 70% de EtOH, seguidas por um branqueamento de 10 minutos com 6% de clorina ati-

va + 0,05% de Tween 20, e 5 lavagens com água de torneira estéril. As sementes foram pré-germinadas na luz (30-50  $\mu$ Einstein m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) durante 24 horas a 24°C em água de torneira estéril (cerca de 10-12mL de água de torneira em Placa de Petri Falcon Optilux de 9 cm, nr. 1005).

- 5 As sementes pré-germinadas foram colocadas em meio de germinação e permitidas para se desenvolver com o seguinte regime de luz: 12 horas na luz/12 horas no escuro ou 16 horas na luz/8 horas no escuro (30-50  $\mu$ Einstein m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) a 23 a 24°C durante cerca de 2 a 3 semanas. As cepas de *A. rhizogenes* se desenvolveram em placas de ágar com meio YEB, enquanto as cepas de *A. tumefaciens* se desenvolveram em placas de ágar com meio minA suplementado com antibióticos apropriados para selecionar a manutenção do vetor de T-DNA.
- 10

- Para transformação, as folhas foram cortadas em duas metades e colocadas em meio de indução de calo. As bactérias *A. rhizogenes* e *A. tumefaciens* foram ressuspensas em meio padrão para obter OD600 de cerca de 0,2 a 0,3, misturadas em uma proporção de 1:1 e usadas para incubação das partes de folha durante cerca de 5 minutos. Subseqüentemente, a suspensão bacteriana foi removida e as partes de folha infectadas foram colocadas em meio padrão e incubadas durante cerca de 3 dias (23 a 24°C; 30  $\mu$ Einstein m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>; 12 horas na luz/12 horas no escuro ou 16 horas na luz/8 horas no escuro).
- 15
- 20

- Posteriormente, os explantes de folha foram lavados 3 vezes com "Meio padrão" que contém 500mg/L de tricarcilina (Duchefa) e transferidos para (20 a 30 mg/L de glufosinato) "Meio padrão" que contém (20 a 30 mg/L de glufosinato e 500mg/L de tricarcilina e adicionalmente cultivadas a 23 a 24°C; 30  $\mu$ Einstein m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>; 12 horas na luz/12 horas no escuro ou 16 horas na luz/8 horas no escuro.
- 25

- Os explantes de folha foram transferidos a cada semana para meio fresco. Após 3 a 4 semanas as raízes emergentes foram cortadas e transferidas para "Meio de prolongamento de raiz fasciculada". Quando as raízes possuírem poucos centímetros, uma cultura de raiz fasciculada em erlenmeyers de 250mL que contém 50mL de "Meio de cultura de raiz" + 250
- 30

mg/L de tricarcilina foi iniciada. As culturas foram agitadas (110rpm) no escuro a 23 a 24°C e subcultivada toda semana. A concentração de tricarcilina foi gradualmente reduzida. Quando as raízes estiverem se desenvolvendo bem, as raízes são divididas em partes de cerca de 1,5 cm e os explantes foram

5 distribuídos sobre diversos erlenmeyers.

As culturas de raiz fasciculada também poderiam ser cultivadas em meio sólido, dessa forma as culturas foram transferidas a cada duas semanas para "Meio de prolongamento de raiz fasciculada" fresco.

Um protocolo similar pode ser usado para gerar culturas de raiz

10 fasciculada de algodão.

#### Exemplo 2: Análise Histoquímica das culturas de raiz fasciculada.

As raízes fasciculadas das diferentes culturas de raiz fasciculada obtidas por co-infecção entre *A. rhizogenes* e *A. tumefaciens* que transportam os vetores de T-DNA diferentes descritos no Exemplo 1 foram maculadas de forma histoquímica para visualizar compostos diferentes das células,

15 e microscopicamente analisadas.

A localização de proteína de fusão NODC-EGFP pode ser visualizada utilizando a fluorescência verde da parte GFP. N-acetilglicosamina pode ser tanto detectada após a reação imunológica com anticorpos monoclonais IgM em N-acetilglicosamina (BIODESIGN) como utilizar Alexa Fluor 488-Aglutinina de Germe de Trigo. O retículo endoplasmático foi maculado utilizando o corante ER-Tracker Blue White DPX. O aparelho de Golgi foi visualizado utilizando BODIPY-TR. As paredes celulares foram maculadas utilizando Calcoflúor White (Branqueador fluorescente 28). Os núcleos foram

20 maculados utilizando Hoechst 33342.

As células ciliadas radiculares histoquimicamente maculadas foram examinadas por meio de microscopia de fluorescência, utilizando um microscópio Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com Apotoma (Zeiss) para permitir os cortes ópticos. Axio Vision 4.2 (Zeiss) foi usado para

30 processamento de imagem.

Os seguintes protocolos foram usados nos diferentes métodos histoquímicos:

#### A. Coloração com Calcoflúor de paredes celulares.

Calcoflúor White (ou Branqueador Fluorescente 28) é um composto orgânico incolor que produz fluorescência em uma cor azulada clara sob radiação ultravioleta ( $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ ).

- 5 O espécime que será maculado é imerso durante 15 a 30 minutos em meio de cultura ou PBS (solução tampão) que compreende Branqueador Fluorescente 28 em  $50 \mu\text{g/mL}$  de concentração final. O espécime é então lavado com meio ou tampão, e as amostras são examinadas utilizando microscópio equipado para microscopia de fluorescência utilizando o conjunto de filtro Zeiss 18. As paredes celulares produzem fluorescência em uma cor azulada clara.

#### B. Coloração histoquímica do complexo de Golgi e retículo endoplasmático em células vivas

- 15 Para macular o complexo de Golgi, as raízes cultivadas durante cerca de 5 dias em meio de cultura líquido de raiz foram usadas. Estas raízes foram lavadas com meio de cultura de raiz fresco e incubadas durante cerca de 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  com  $1 \mu\text{M}$  de BODIPY TR C5-ceramida (Sondas moleculares, Cat Nº B-34400). As raízes foram lavadas poucas vezes com meio de cultura de raiz e incubadas em meio de cultura de raiz fresco em 20 temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação suave. As raízes foram então lavadas com meio de cultura de raiz fresco e examinadas com um microscópio de fluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Germany) utilizando Filterset 00 (excitação: BP530/585; emissão: LP615).

- 25 Para coloração de ER, as raízes cultivadas durante cerca de 5 dias em meio de cultura líquido de raiz foram usadas. Estas raízes foram lavadas com meio de cultura de raiz fresco e incubadas com ER-Tracker Blue-White DPX ( $100 \text{ nM}$ ) dissolvido em meio de cultura de raiz durante cerca de 2 horas com agitação suave. As raízes foram lavadas poucas vezes com meio de cultura de raiz e examinadas com um microscópio de fluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Germany) utilizando Filterset 02 (excitação: 30 G365; emissão: LP420).

C. Detecção imunoistoquímica de montagem inteira de N-acetilglicosamina incorporada na parede celular de raízes (fibras da raiz)

As raízes das diferentes culturas de raiz fasciculada se desenvolveram em cultura líquida durante 6 dias, tanto suplementadas com 50 mM de GlcNAc como sem qualquer suplemento. As raízes foram fixadas e desidratadas, re-hidratadas e a parede celular permeabilizada da seguinte maneira.

Quando a amostra for incubada com N-acetilglicosamina o excesso de N-acetilglicosamina é lavado incubando 4 vezes em 10 minutos com solução PBS.

As amostras foram fixadas por incubação e infiltração à vácuo de solução AA (incubação: quatro vezes em 1 h, cada vez seguida por 5 min de infiltração à vácuo). A solução AA contém 50% de EtOH e 5% de ácido acético.

Em uma próxima etapa, as amostras são desidratadas por lavagem com 50% de EtOH e lavagem 2 x em 30 minutos com 50% de EtOH, seguida por 60 minutos de incubação em 70% de EtOH. As amostras podem ser armazenadas neste estágio a -20°C.

Subseqüentemente, as amostras foram submetidas à permeabilização de parede celular, por lavagem durante 5 minutos com 50% de EtOH, lavagem 2 x em 5 minutos com PBT (PBS com 0,1% de Tween20), lavagem 2 x em 5 minutos com PBT + 0,3% de Triton X100 e por fim lavagem 2 x em 5 minutos com PBS (150mM de NaCl; 10mM de Na-tampão fosfato; pH 7,4).

As raízes permeabilizadas são transferidas para uma placa de Petri que contém água-MQ, e montadas sobre uma lâmina de microscópio "tratada com Vectaboin". As lâminas são assadas sobre um leitor de placa TLC durante 45 minutos a 55°C. Uma etapa de bloqueio é realizada ao incubar as lâminas durante uma hora com solução de bloqueio (1% de BSA em PBT). Subseqüentemente, 1% de solução de bloqueio é substituído por cerca de 400µL de anticorpo monoclonal IgM para N-acetilglicosamina (1µg/mL em solução de bloqueio; BIODSIGN, Cat No H67108M) e incubada durante

uma hora. As lâminas são subsequenteiramente lavadas 3 vezes 5 a 10 minutos com solução de bloqueio. A solução de bloqueio é então substituída por cerca de 400µL de anticorpo IgM de Cabra AntiCamundongo marcado com Alexa Fluor 488 (3µg/mL em solução de bloqueio; Sondas Moleculares, Cat N° A-21042) e incubada durante uma hora. Depois, as lâminas são lavadas 5 a 10 minutos com solução de bloqueio, 2 vezes 5 a 10 minutos com PBT e poucas vezes com PBS para remover Tween20. Os resultados são avaliados por meio de microscopia de fluorescência com um microscópio Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemanha) utilizando Filterset 38 (excitação: BP470/40; emissão: BP525/50).

#### D. Detecção mediada por aglutinina de germe de trigo de N-acetilglucosamina

As raízes das diferentes culturas de raiz fasciculada se desenvolveram em cultura líquida durante 6 dias, tanto suplementadas com 50 mM de GlcNAc como sem qualquer suplemento. As raízes foram fixadas e desidratadas, re-hidratadas e a parede celular permeabilizada como descrito na seção C acima.

A aglutinina de germe de trigo se liga seletivamente a resíduos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilneuramínico. O ácido N-acetilneuramínico não ocorre em plantas. Portanto, em plantas, a aglutinina de germe de trigo pode ser usada para detectar especificamente resíduos de N-acetilglicosamina.

As raízes permeabilizadas foram colocadas em Placas de Petri de 9 cm dotadas de PBT. As raízes foram, então transferidas para as cavidades de placas de cultura de 6 cavidades que contêm cerca de 1,7 µg/mL de Aglutinina de Germe de Trigo marcada com Alexa Fluor 488 (Sondas Moleculares, Cat No W-11261) em PBT e incubadas durante uma hora. As amostras foram subsequenteiramente lavadas 3 x durante 10 minutos com PBT e duas vezes durante 5 minutos com PBS (para remover Tween20). As amostras foram colocadas sobre uma lâmina de microscópio "tratada com Vectabond" ou "Tissue Tack" em uma gota de PBS. Após a remoção da maior parte de PBS a lamínula foi montada. Os resultados foram avaliados por meio de microscopia de fluorescência utilizando um microscópio de fluo-

rescência Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemanha) que utiliza Filterset 38 (excitação: BP470/40; emissão: BP525/50).

#### E. Análise de GFP.

5 A fluorescência de EGFP foi avaliada por meio de microscopia de fluorescência com um microscópio Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemanha) utilizando Filterset 38 (excitação: BP470/40; emissão: BP525/50).

#### Resultados

##### 1. Localização de N-acetilglicosamina na parede celular

10 As células ciliadas radiculares que compreendem o gene quimérico NODC foram maculadas de forma imunoistoquímica na presença de N-acetilglicosamina e subsequente maculadas com Calcoflúor para visualizar as paredes celulares. A Figura 3 mostra um conjunto representativo de fotografias de cortes ópticos que utiliza um microscópio de fluorescência, por meio deste o painel A mostra a fluorescência (azul) que visualiza a parede  
15 celular, e o painel B mostra a fluorescência (verde) que visualiza N-acetilglicosamina. Como pode ser observado a partir da sobreposição de ambos os cortes ópticos no painel C, a presença de N-acetilglicosamina é exclusivamente detectada nas paredes celulares das células ciliadas radiculares.

##### 20 2. Co-localização de proteínas NODC e do aparelho de Golgi

25 As células ciliadas radiculares que compreendem o gene quimérico que expressa a proteína de fusão NODC-EGFP foram maculadas para visualizar o aparelho de Golgi e, subsequente maculadas com Calcoflúor para visualizar as paredes celulares. A Figura 4 mostra um conjunto representativo de fotografias de cortes ópticos que utiliza um microscópio de fluorescência, por meio deste o painel B mostra a fluorescência (azul) que visualiza a parede celular, o painel C mostra a fluorescência (vermelha) associada ao aparelho de Golgi e o painel D mostra a fluorescência (verde) que visualiza a proteína de fusão NODC-EGFP. Como pode ser observado a  
30 partir da sobreposição dos cortes ópticos no painel A, a localização da proteína de fusão NODC-EGFP coincide com a localização do aparelho de Golgi nas células ciliadas radiculares.

### 3. Expressão de quitina sintase em células de plantas requer alimentação externa com GlcNAc para detectar N-acetilglicosamina nas paredes celulares.

As raízes que expressam uma quitina sintase quimérica de *Neurospora crassa* foram cultivadas como descrito acima na presença ou ausência de N-acetilglicosamina externamente adicionada. Após lavagem cuidadosa, as raízes foram maculadas de forma histoquímica para detectar N-acetilglicosamina. Na Figura 5, o painel A (raízes fasciculadas com alimentação externa de GlcNAc) inúmeros pontos verde fluorescente podem ser detectados, enquanto que no painel B (raízes fasciculadas sem alimentação externa de GlcNAc) muito poucos pontos verde-fluorescente poderiam ser detectados.

#### Exemplo 3: Demonstração bioquímica de oligômeros tipo quitina na parede celular de Arabidopsis p35S::raízes fasciculadas NODC

As raízes fasciculadas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) de p35S:NODC-p35S:bar, obtidas utilizando o vetor de T-DNA pTGK42 e raízes fasciculadas transgênica de controle de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) de p35S:bar obtidas utilizando pTCO192 (controle) foram analisadas na presença de N-acetilglicosamina utilizando o ensaio de Morgan-Elson.

Para esta finalidade, cerca de 100mg de raízes fasciculadas foram colhidos em cerca de 20µL de tampão (25mM de tampão K-fosfato pH 6,0) e moídas com areia do mar, precipitados e o teor de proteína do extrato determinado (para propósitos de padronização). Os sobrenadantes foram removidos e as raízes foram ressuspensas em 100µL de tampão. 1 Unidade de celulase (Cellulase "Onozuka R-10" de *Trichoderma viride* (Serva, Cat Nº 16419): 10U/mL em tampão) ou 1 Unidade de quitinase (Quitinase de *Serratia marcescens* (Sigma, Cat Nº C1650): 10U/mL em tampão) ou ambas foram adicionadas a amostras diferentes e incubadas durante a noite a 25°C.

Um ensaio de Morgan-Elson para medir N-acetilglicosamina foi realizado sobre as amostras na manhã seguinte. No método colorimétrico empregado, que se baseia na reação de Morgan-Elson, a extremidade de

redução de N-acetil-glicosamina é sucessivamente transformada nos cromogênios I e II sob as condições alcalinas a 100°C. O tratamento subsequente com uma mistura de HCl concentrado e ácido sulfúrico concentrado resulta na eliminação de água produzindo o cromogênio III da reação de Morgan–

5 Elson. Na etapa final da reação, o cromogênio III é permitido para reagir com DMAB, p-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Ehrlich) para formar um produto de cor vermelha cuja concentração pode ser determinada ao medir a absorção a 585nm.

UDP N-acetilglicosamina, e N-acetilglicosamina-1-fosfato falham

10 ao fornecer o teste a menos que estas sejam anteriormente hidrolisadas com ácido. Os nucleotídeos podem ser hidrolisados por aquecimento a 100° em 0,01 N de ácido durante 15 minutos, porém o açúcar-fosfato requer condições mais rigorosas, por exemplo, 5 minutos a 100° em 0,1 N de HCl.

Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

15 Tabela 2. Valores de OD585 após o ensaio de Morgan-Elson

| Cultura de raiz fasciculada | Tampão | Celulase | Quitinase | Celulase quitinase |
|-----------------------------|--------|----------|-----------|--------------------|
| Controle                    | 0,070  | 0,100    | 0,117     | 0,157              |
| p35S:NODC                   | 0,056  | 0,096    | 0,100     | 0,252              |

A partir destes resultados pode-se concluir que os polímeros tipo quitina estão incluídos na parede celular.

Exemplo 4: Análise de quitoooligo e monossacarídeos em material de parede celular de planta utilizando HPTLC

20 As paredes celulares das raízes radiculares de Arabidopsis do Exemplo 1 (35S::NODC; 35S::NODC\_EGFP) e 35S::raízes fasciculadas de controle *bar* foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo

Preparação de paredes celulares

- Colher raízes fasciculadas;
- 25 - remover a maior parte do meio com um tecido
- Lavar o tecido com tampão PBS
- Colocar cerca de 1g de tecido em um tubo
- Congelar com nitrogênio líquido

- Moer o tecido em um almofariz
- Transferir o tecido moído em um funil com talagarça
- Lavar com poucos litros de água desmineralizada
- Vedar a talagarça e transferir para uma garrafa de 500 mL que contém 500 mL de etanol
- Lavar durante 15 minutos com 500mL de etanol, refrigerar o etanol e lavar durante outros 15 minutos
- Substituir o etanol por 250 mL de éter e lavar durante 15 minutos.

10 O material restante é o "material de parede celular". Secar e pesar o material de parede celular e transferir o mesmo para um tubo.

#### Extração de quitooligos de material de parede celular

- Adicionar 300  $\mu$ L de água MQ a 10 mg de material de parede celular (utilizar um tubo de 25 ou 50 ml), ferver durante 3 minutos e incubar durante 2 horas a 80°C (agitar). O material de parede celular pode ser digerido com quitinase e mistura enzimática de  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase: 0,5 U quitinase em 50 $\mu$ L 125mM de Na-fosfato - 2mM CaCl<sub>2</sub> - pH 6 (Quitinase Sigma C7809 ou C6137 → digerir (quitooligo) sacarídeos muito rapidamente em N-acetilglicosamina. Quitinase BioLabs P5206S → digerir penta-N-acetilquitose (lentamente) em di e tri-quitooligos);
- Adicionar 100  $\mu$ L de mistura enzimática a cerca de 5 mg de material de parede celular;
- Incubar durante a noite a 25°C;
- O tampão pode ser separado do material de parede celular por centrifugação.

25 Após a extração, o tampão que contém os quitooligos é manchado sobre placas HPTLC (placas HPTLC NH<sub>2</sub> (sem indicador fluorescente) 10 x 20 cm (Merck, Art. 12572)) juntamente com uma mistura de solução padrão de quitooligossacarídeo em H<sub>2</sub>O. A solução padrão compreende N-acetilglicosamina, quitobiose, quitotriose, quitotetraose e quitopentaose.

Os seguintes solventes desenvolvidos podem ser usados:

- n-butanol (70) : ácido acético (20) : H<sub>2</sub>O (10) (Tampão D)

- acetonitrila (76) : H<sub>2</sub>O (24) : 0,5% de solução aquosa de ácido bórico (10) (Tampão A)

- acetonitrila (10) : isopropanol (67) : 50mM de KCl (23) (Tampão B)

5                   • n-butanol (50) : etanol (30) : H<sub>2</sub>O (20) (Tampão C)

### Cromatografia

- Limpar as placas por revelação com metanol

- Marcar 1(-2) µL de soluções padrão (15 mm de fundo) e 1 a 5 µL de amostras em faixas de cerca de 6 mm de comprimento

10                   - Revelar placas em "CAMAG Câmaras "Twin Through"": 7 a 7,5 cm de distância de migração

- Câmaras "Twin Through" para: placas de 10 x 10 cm → 10 mL de solução reveladora

- placas de 20 x 10 cm → 20 mL de solução reveladora

15                   - Secar as placas com ventilador

- Aquecer as placas a cerca de 150°C durante 20 minutos (leitor de placa TLC)

- Visualizar açúcares com UV (366 nm)

### Cromatografia-2D

20                   - Limpar as placas por revelação com metanol

- Marcar 1 a 5 µL de amostras em faixa de 3 mm: ângulo direito de placa (15 mm de fundo e 15 mm de sítio)

- Revelar placas na primeira direção em "CAMAG Câmaras "Twin Through"": 7 a 7,5 cm de distância de migração

25                   - Câmaras "Twin Through" para: placas de 10 x 10 cm → 10 mL de solução fotoreveladora

- Secar as placas com ventilador

- Desenvolver as placas em outra direção

- Secar as placas com ventilador

30                   - Aquecer as placas a cerca de 150°C durante 20 minutos (leitor de placa TLC)

- Visualizar os açúcares com UV (366 nm).

A Figura 6 mostra os resultados de HPTLC unidimensional, por meio do qual o material de parede celular foi extraído, porém não adicionalmente digerido com quitinase. A Figura 7 mostra os resultados de uma HPTLC bidimensional após digestão com quitinase. Nenhum quitoooligômero pode ser detectado nas plantas de controle, porém quantidades significativas de quitoooligômeros estão presentes em plantas que compreendem um gene da N-acetilglicosamina transferase.

As plantas transgênicas de *Arabidopsis* também foram geradas utilizando os genes quiméricos descritos no Exemplo 1. Este material é mais uniforme do que as culturas de raiz fasciculada descritas acima. O material de parede celular foi preparado, os quitoooligosacarídeos extraídos como descrito e HPTLC realizada em Tampão A como descrito aqui. Os resultados são mostrados na Figura 8.

O material de parede celular de 35S transgênico::NodC partes aéreas de *Arabidopsis* mostrou uma grande quantidade de quito-triose, estimada por comparação com as soluções padrão que possuem cerca de 5µg/mg de material de parede celular ou 0,01% do material de folha fresco.

Exemplo 5: Coloração de material de célula de planta de culturas de raiz fasciculada de *Arabidopsis*.

As culturas de raiz fasciculada de *Arabidopsis* foram geradas como no Exemplo 1, o material de parede celular destas foi preparado como descrito no Exemplo 5 e armazenado a -20°C. O material de parede celular foi maculado com um corante aniônico (Vermelho Congo) ou um corante reativo à amino (Alexa Fluor 488 éster tetrafluorofenila).

Coloração com Vermelho Congo

- O material de parede celular armazenado a -20°C de raízes fasciculadas NODC ou plantas de controle foi re-hidratado em tampão acetato pH 5 (50 mg de material de parede celular/tubo)

- O material foi maculado com 0,03% de vermelho Congo dissolvido em tampão acetato pH 5

- O material de parede celular foi lavado com tampão acetato pH 5 e com tampão PBS poucas vezes

- Todo o material de parede celular foi transferido para as cavidades de uma placa de 48 cavidades

- Sob condições de iluminação padrão, imagens digitais foram obtidas a partir de poços individuais e o valor médio de cinza da imagem

5 digital foi determinado

#### Resultados:

##### Amostra 1:

|          | Média  | Mínimo | Máximo | IntDen      | Médiano |
|----------|--------|--------|--------|-------------|---------|
| NodC     | 89,390 | 76     | 126    | 3460186     | 89      |
| Controle | 97,761 | 83     | 136    | 3784246,000 | 97      |

##### Amostra 2

|          | Média   | Mínimo | Máximo | IntDen   | Médiano |
|----------|---------|--------|--------|----------|---------|
| NodC     | 101,548 | 86     | 130    | 3479355  | 101     |
| Controle | 108,109 | 90     | 139    | 13704154 | 108     |

##### Amostra 3

|          | Média   | Mínimo | Máximo | IntDen  | Médiano |
|----------|---------|--------|--------|---------|---------|
| NodC     | 97,866  | 81     | 120    | 3650012 | 98      |
| Controle | 104,634 | 85     | 134    | 3902418 | 104     |

10 O material de parede celular de raízes fasciculadas que contém um gene quimérico NodC corado de forma reproduzível mais intenso do que o material de parede celular de plantas de controle. Os valores de cinza do material de parede celular eram cerca de 5 a 10% menores do que aqueles de plantas de controle.

#### 15 B. Coloração com Alexa Fluor 488 éster de tetrafluorofenila

- O material de parede celular armazenado a -20°C de raízes fasciculadas de NODC ou plantas de controle foi re-hidratado em tampão PBS pH 5 (50 mg de material de parede celular/tubo), e tratado com proteínase K (100µg/ml) durante a noite a 56°C.

20 - O material foi intensivamente lavado com tampão PBS e marcado com Alexa Fluor 488 éster de tetrafluorofenila. Alexa flúor 488 TFP éster está disponível como um kit (Alexa flúor 488 Kit de Marcação de Anticorpo Monoclonal (Sondas Moleculares, A-20181)

- O material corado pode ser examinado utilizando microscopia de fluorescência, por exemplo, com filtro de Zeiss 38.

O material de parede celular de raízes fasciculadas que contém um gene quimérico NodC corado de forma reproduzível mais intenso do que o material de parede celular de plantas de controle.

#### Exemplo 6: Plantas transgênicas de algodão

As plantas transgênicas de algodão que compreendem um gene quimérico NODC como descrito no Exemplo 1, ou um gene quimérico NODC sob controle do promotor seletivo por fibra F285 (como descrito em US2003/106097) são geradas utilizando o método como descrito em US6483013.

As fibras destas plantas transgênicas de algodão são isoladas, e usadas para produzir fios e tecidos com reatividade aperfeiçoada, tal como durabilidade de cor aperfeiçoada.

#### Exemplo 7: Fibras de algodão com reatividade aumentada.

As plantas transgênicas de algodão que compreendem uma região codificadora NodC ligada de forma operável a um promotor CaMV35S foram geradas como descrito no Exemplo 6. As fibras de algodão maduras foram colhidas destas plantas e coradas com Vermelho Congo ou reagidas com WGA-Alexa flúor 555.

#### A. Coloração com Vermelho Congo

As fibras de algodão maduras foram colhidas de plantas transgênicas de algodão que compreendem um gene quimérico NodC, bem como de plantas de controle que não compreendem um gene quimérico NodC. Os lipídeos foram removidos das fibras por lavagem com etanol e éter. As fibras de algodão foram secas.

Vinte e cinco mg de fibras foram rehidratados em tampão de acetato de pH 5 e corados com 0,03% de vermelho Congo dissolvido em tampão de acetato de pH 5. O material de parede celular foi lavado com tampão de acetato de pH 5 e com tampão de PBS poucas vezes.

As fibras coradas foram analisadas por microscopia de campo claro e por microscopia de fluorescência (filtro Zeiss 18). As imagens digitais

de fibras coradas em uma placa de 48 cavidades também foram analisadas como descrito no Exemplo 5A.

Sob microscopia de campo claro, as fibras de algodão colhidas das plantas transgênicas de algodão NodC pareceram vermelhas mais intensas do que as fibras de algodão das plantas não-transgênicas. Esta diferença foi ainda mais evidente quando se analisa as fibras sob microscopia de fluorescência.

Os valores médios de cinza obtidos nas fibras de algodão coradas de vermelho congo das plantas transgênicas NodC também eram significativamente menores do que nas fibras de algodão de plantas não-transgênicas, confirmando a coloração mais intensa por corantes aniônicos das fibras das plantas transgênicas de algodão.

|          | Área  | Média  | Mínimo | Máximo | IntDen  | Médiano |
|----------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| NodC     | 38958 | 81,388 | 72     | 179    | 3170716 | 80      |
| Controle | 38958 | 86558  | 79     | 160    | 3372108 | 85      |

A diferença em coloração foi mantida e ainda intensificada quando as fibras foram tratadas durante pelo menos uma hora com NaOH quente (60% a 80°C). Este tratamento remove proteínas, substâncias pécicas e ceras, e é capaz de desacetilação dos quito oligômeros.

A coloração vermelho congo intensificada foi, além disso, distribuída uniformemente na parede celular, como pode ser observado quando forem feitos cortes microscópicos virtuais de células de fibra individuais.

## 20 B. Coloração com WGA-Alexa 555

A detecção de oligômeros de N-acetilglicosamina em fibras de algodão de plantas transgênicas de NodC foi feita essencialmente como descrito no Exemplo 2. As fibras de algodão não precisam ser desidratadas ou permeabilizadas. De preferência, os lipídeos e ceras foram removidos ao tratar as fibras 3 vezes durante 10 minutos em uma mistura de clorofórmio: metanol (1:1), seguido por duas vezes por um tratamento de 10 minutos em acetona e duas vezes durante 5 minutos em éter. As fibras foram permitidas para secagem a ar.

As fibras foram coradas tanto com WGA-Alexa555, WGA-

Alexa488 como WGA-tetrametilrodamina.

As fibras foram colocadas em solução de bloqueio (150 mM de NaCL, 10 mM de tampão de fosfato de sódio pH 7,4; 0,1% de Tween 20 e 1% de albumina de soro bovino) e incubadas durante uma hora. Posteriormente, o tampão foi substituído pelo mesmo tampão que contém WGA-fluorocromo e incubado durante 4 h. A solução de WGA-fluorocromo foi substituída por solução de bloqueio, lavada durante 10 minutos, seguido por 3 vezes durante 10 minutos, lavagem com solução bloqueio sem BSA, e 2 vezes durante 5 minutos, lavagem com solução de bloqueio sem BSA e sem Tween. As fibras coradas foram montadas sobre uma lamina de microscópio e avaliadas por meio de microscopia de fluorescência (Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemanha) utilizando Filterset 38 (excitação: BP470/40; emissão: BP525/50 ) para conjugado de Alexa flúor 488 ou Filterset 20 (excitação: BP546/12; emissão: BP575-640) pra conjugado de Alexa flúor 555 ou tetrametilrodamina.

Considerando-se que nenhuma fluorescência específica poderia ser detectada em fibras de algodão de plantas não-transgênicas, uma fluorescência brilhante foi detectável em fibras de algodão de gene quimérico NodC que compreende plantas de algodão (vide Figura 9). Os cortes microscópicos virtuais das fibras de algodão indicaram que WGA-fluor555 é uniformemente distribuído por toda a parede de célula secundária das células de fibra de algodão.

Exemplo 9: Reatividade de paredes celulares de raízes fasciculadas de Arabidopsis que compreendem uma quitina sintase de Neurospora crassa com sinal de marcação de Golgi.

Utilizando-se técnicas de DNA recombinante padrão, uma N-acetilglicosamina transferase exprimível por planta que compreende uma sequência de sinal heteróloga de marcação de Golgi, foi construída com os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

- uma região de promotor 35S de CaMV
- um fragmento de DNA que codifica uma sequência líder não-traduzida (5'Cab22L)

- um fragmento de DNA que codifica os 35 aminoácidos N-terminal de  $\beta$ -1,2- xilosiltransferase de *Arabidopsis thaliana*

- um fragmento de DNA que codifica CHS2 (quitina sintase) de *Neurospora crassa* clonado em estrutura com o fragmento de DNA anterior

5                   • uma terminação de transcrição e sinal de poliadenilação da transcrição 35S de CaMV (3' 35S).

O gene quimérico foi introduzido entre as margens de T-DNA de um vetor de T-DNA juntamente com um gene quimérico *bar* que proporciona resistência à fosfinotricina. O vetor de T-DNA resultante foi nomeado pTD-  
10 BI37. A sequência do T-DNA deste vetor é proporcionada na SEQ ID No 13.

Os vetores de T-DNA foram introduzidos em *A. tumefaciens* e usados para gerar culturas de raiz fasciculada como descrito no Exemplo 1.

Os oligômeros de N-acetilglicosamina poderiam ser detectados na parede celular das culturas de raiz fasciculada após a incubação com  
15 domínio de ligação de quitina conjugado com fluoresceína, por microscopia de fluorescência.

Os oligômeros de N-acetilglicosamina também poderiam ser detectados na parede celular das culturas de raiz fasciculada utilizando WGA-Alexa555 como descrito no Exemplo 2. Ademais, a fluorescência também  
20 poderia ser observada com glóbulos no citoplasma, correspondente ao aparelho de Golgi.

#### Exemplo 9: Determinação do teor de nitrogênio de fibras de algodão.

As bolas de algodão maduro foram colhidas das plantas de algodão transgênicas do Exemplo 7. De cada bola, 20 mg de fibras clonadas  
25 foram analisados. Para este fim, os lipídeos e ceras foram removidos das fibras por lavagem 3 vezes durante 20 minutos em uma mistura de clorofórmio : metanol (1:1); 2 vezes durante 20 minutos em acetona; 2 vezes durante 5 minutos em éter e permitidos para secagem a ar.

O nitrogênio total na superfície de fibras foi medido utilizando o  
30 kit de análise de "Nitrogênio Total" e Fotômetro C214 Multiparameter Bench de HANNA Instruments (Rhode Island, USA).

Os seguintes resultados foram obtidos:

|                             | Tipo selvagem        | Transgênico |
|-----------------------------|----------------------|-------------|
| Média                       | 56 mg/L N            | 85 mg/L N   |
| Número de bolas de algodão  | 9                    | 10          |
| Erro padrão                 | 2,6 mg/L N           | 5,1 mg/L N  |
|                             |                      |             |
| Teste-t ( $\alpha = 0.05$ ) |                      |             |
| Duas extremidades P         | $2,2 \times 10^{-4}$ |             |

As fibras das bolas de algodão das linhas transgênicas contêm nitrogênio estatisticamente mais significativo na superfície do que as fibras de bolas de algodão tipo selvagem.

Exemplo 10: Expressão específica de fibra de uma quitina sintase em algodão.

Utilizando-se técnicas de DNA recombinante padrão, uma N-acetilglicosamina transferase exprimível por planta que compreende uma sequência de sinal de marcação heteróloga, foi construída com os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

- uma região de promotor específica de fibra de algodão
- um fragmento de DNA que codifica uma sequência líder não-traduzida (5' Cab22L)
- um fragmento de DNA que codifica os 35 aminoácidos N-terminal de  $\beta$ -1,2-xilosiltransferase de *Arabidopsis thaliana*
- um fragmento de DNA que codifica CHS2 (quitina sintase) de *Neurospora crassa* clonado em estrutura com o fragmento de DNA anterior
- uma terminação de transcrição e sinal de poliadenilação da transcrição 35S de CaMV (3' 35S).

O gene quimérico foi introduzido entre as margens de T-DNA de um vetor de T-DNA juntamente com um gene quimérico *bar* que proporciona resistência à fosfinotricina. O vetor de T-DNA resultante foi nomeado pTD-BI50. A sequência do T-DNA deste vetor é proporcionado na SEQ ID Nº 14.

Os vetores de T-DNA são introduzidos em *A. tumefaciens* e usados para gerar algodão transgênico. As fibras isoladas de bolas de algodão de plantas transgênicas possuem uma quantidade aumentada de oligômeros de N-acetilglicosamina, mais ou menos uniformemente distribuídas por toda a parede celular.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Bayer BioScience N.V.  
 De Block, Marc  
 Meulewaeter, Frank  
 5 Koch, Rainhard  
 Essigmann, Bernd  
 <120> MÉTODOS PARA ALTERAR A REATIVIDADE DE PAREDES CELULARES DE PLAN-  
 TAS  
 <130> BCS 05-2016-WO1  
 10 <150> EP 05076488.5  
 <151> 2005-06-24  
 <150> US 60/698182  
 <151> 2005-07-11  
 <150> EP 06008463.9  
 15 <151> 2006-04-25  
 <160> 15  
 <170> PatentIn versão 3.3  
 <210> 1  
 <211> 395  
 20 <212> PRT  
 <213> Azorhizobium caulinodans  
 <400> 1  
 Met Ser Val Val Asp Val Ile Gly Leu Leu Ala Thr Ala Ala Tyr Val  
 1 5 10 15  
 25 Thr Leu Ala Ser Ala Tyr Lys Val Val Gln Phe Ile Asn Val Ser Ser  
 20 25 30  
 Val Thr Asp Val Ala Gly Leu Glu Ser Asp Ala Leu Pro Leu Thr Pro  
 35 40 45  
 Arg Val Asp Val Ile Val Pro Thr Phe Asn Glu Asn Ser Ser Thr Leu  
 30 50 55 60  
 Leu Glu Cys Val Ala Ser Ile Cys Ala Gln Asp Tyr Arg Gly Pro Ile  
 65 70 75 80

Thr Ile Val Val Val Asp Asp Gly Ser Thr Asn Lys Thr Ser Phe His  
 85 90 95  
 Ala Val Cys Asp Lys Tyr Ala Ser Asp Glu Arg Phe Ile Phe Val Glu  
 100 105 110  
 5 Leu Asp Gln Asn Lys Gly Thr Ala Ala Gln Met Glu Ala Ile Arg Arg  
 115 120 125  
 Thr Asp Gly Asp Leu Ile Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Val Ile Asp  
 130 135 140  
 Lys Asp Val Val Thr Lys Leu Ala Ser Ser Met Arg Ala Pro Asn Val  
 10 145 150 155 160  
 Gly Gly Val Met Gly Gln Leu Val Ala Lys Asn Arg Glu Arg Ser Trp  
 165 170 175  
 Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn Glu Glu  
 180 185 190  
 15 Arg Ile Ala Gln Ser Arg Phe Gly Ser Val Met Cys Cys Cys Gly Pro  
 195 200 205  
 Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Ile Thr Pro Leu Leu Ala Glu Tyr  
 210 215 220  
 Glu His Gln Thr Phe Leu Gly Arg Pro Ser Asn Phe Gly Glu Asp Arg  
 20 225 230 235 240  
 His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Gly Tyr Val  
 245 250 255  
 Pro Ser Ala Val Ala Arg Thr Leu Val Pro Asp Gly Ser Pro Tyr Leu  
 260 265 270  
 25 Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Tyr Arg Asp Thr Ala Leu  
 275 280 285  
 Ala Leu Arg Ile Lys Lys Asn Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Phe Glu Ile  
 290 295 300  
 Cys Ala Gln Asn Leu Gly Thr Ala Leu Leu Leu Val Met Thr Met Ile  
 30 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gln Thr Pro Val Ile Ile Leu  
 325 330 335

Gly Val Val Val Gly Met Ser Ile Ile Arg Cys Cys Ser Val Ala Leu  
 340 345 350  
 Ile Ala Lys Asp Phe Arg Phe Leu Tyr Phe Ile Val His Ser Ala Leu  
 355 360 365  
 5 Asn Val Leu Ile Leu Thr Pro Leu Lys Leu Tyr Ala Leu Leu Thr Ile  
 370 375 380  
 Arg Asp Ser Arg Trp Leu Ser Arg Glu Ser Ser  
 385 390 395  
 <210> 2  
 10 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> Bradyrhizobium japonicum  
 <400> 2  
 Met Asp Leu Leu Ala Thr Thr Ser Ala Ala Ala Val Ser Ser Tyr Ala  
 15 1 5 10 15  
 Leu Leu Ser Thr Ile Tyr Lys Ser Val Gln Ala Leu Tyr Ala Gln Pro  
 20 25 30  
 Ala Ile Asn Ser Ser Leu Asp Asn Leu Gly Gln Ala Glu Val Val Val  
 35 40 45  
 20 Pro Ala Val Asp Val Ile Val Pro Cys Phe Asn Glu Asn Pro Asn Thr  
 50 55 60  
 Leu Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Ala Ser Gln Asp Tyr Ala Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Met Gln Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Ala Asn Arg Asp Val Val  
 25 85 90 95  
 Ala Pro Val His Arg Ile Tyr Ala Ser Asp Pro Arg Phe Ser Phe Ile  
 100 105 110  
 Leu Leu Ala Asn Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile  
 115 120 125  
 30 Arg Ser Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile  
 130 135 140  
 Leu Ala Ala Asp Val Val Thr Lys Leu Val Leu Lys Met His Asp Pro

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
|    | Gly Ile Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Ile Ala Ser Asn Arg Asn Gln |     |     |     |
|    |                                                                 | 165 | 170 | 175 |
|    | Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn |     |     |     |
| 5  |                                                                 | 180 | 185 | 190 |
|    | Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys |     |     |     |
|    |                                                                 | 195 | 200 | 205 |
|    | Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Ala Leu Leu Leu Asp |     |     |     |
|    | 210                                                             | 215 | 220 |     |
| 10 | Gln Tyr Glu Ala Gln Phe Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu |     |     |     |
|    | 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
|    | Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu |     |     |     |
|    |                                                                 | 245 | 250 | 255 |
|    | Tyr Val Pro Asp Ala Ile Ala Ala Thr Val Val Pro His Ser Leu Arg |     |     |     |
| 15 |                                                                 | 260 | 265 | 270 |
|    | Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp |     |     |     |
|    |                                                                 | 275 | 280 | 285 |
|    | Thr Phe Leu Ala Trp Arg Leu Leu Pro Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Thr |     |     |     |
|    | 290                                                             | 295 | 300 |     |
| 20 | Leu Asp Val Ile Gly Gln Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Ala Ile Ser |     |     |     |
|    | 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
|    | Ser Leu Ala Ala Leu Ala Gln Leu Leu Ile Asp Gly Ser Ile Pro Trp |     |     |     |
|    |                                                                 | 325 | 330 | 335 |
|    | Trp Thr Gly Leu Thr Ile Ala Ala Met Thr Thr Val Arg Cys Cys Val |     |     |     |
| 25 |                                                                 | 340 | 345 | 350 |
|    | Ala Ala Leu Arg Ala Arg Glu Leu Arg Phe Ile Gly Phe Ser Leu His |     |     |     |
|    |                                                                 | 355 | 360 | 365 |
|    | Thr Pro Ile Asn Ile Cys Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu |     |     |     |
|    | 370                                                             | 375 | 380 |     |
| 30 | Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Lys Val Thr Asp Met |     |     |     |
|    | 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
|    | Pro Thr Glu Glu Gly Lys Gln Pro Val Ile Leu His Pro Asn Ala Gly |     |     |     |

405 410 415  
 Arg Ser Pro Ala Gly Val Gly Gly Arg Leu Leu Leu Phe Val Arg Arg  
 420 425 430  
 Arg Tyr Arg Ser Leu His Arg Ala Trp Arg Arg Arg Arg Val Phe Pro  
 5 435 440 445  
 Val Ala Ile Val Arg Leu Ser Thr Asn Lys Trp Ser Ala Asp Asp Ser  
 450 455 460  
 Gly Arg Lys Pro Ser Val Ile Arg Ala Arg Val Gly Cys Arg Arg Pro  
 465 470 475 480  
 10 Val Ala Pro Arg His  
 485  
 <210> 3  
 <211> 433  
 <212> PRT  
 15 <213> Rhizobium galegae  
 <400> 3  
 Met Thr Leu Leu Glu Thr Ile Gly Ile Ala Ala Val Thr Leu His Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ser Ala Ile Tyr Lys Ser Met Gln Ala Phe Tyr Ala Arg Lys  
 20 20 25 30  
 Ala Ser Gly Ser Gln Pro Arg Ser Lys Asp Ile Asp Pro Ala Ala Leu  
 35 40 45  
 Pro Ser Val Asp Ile Ile Val Pro Cys Phe Asn Glu Asp Pro Ala Ile  
 50 55 60  
 25 Leu Ser Ala Cys Leu Ser Ser Leu Ala Gly Gln Asp Tyr Gly Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Ile Tyr Met Val Asp Asp Gly Ser Cys Asn Arg Glu Ala Ile  
 85 90 95  
 Leu Pro Val His Asp Phe Tyr Thr Ser Asp Pro Arg Phe Glu Phe Leu  
 30 100 105 110  
 Leu Leu Ser Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile  
 115 120 125

Glu Arg Ser Cys Gly Asp Leu Ile Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ser  
 130 135 140  
 Ile Ala Ser Asp Val Val Thr Leu Leu Val Glu Lys Met Arg Asp Ser  
 145 150 155 160  
 5 Asp Val Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Lys Ala Ser Asn Arg Asp Lys  
 165 170 175  
 Asn Leu Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn  
 180 185 190  
 Asp Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys  
 10 195 200 205  
 Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Leu Leu Leu Asp  
 210 215 220  
 Gln Tyr Gln Thr Gln Leu Tyr Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu  
 225 230 235 240  
 15 Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Ser Ala Gly Phe Arg Thr Glu  
 245 250 255  
 Tyr Val Pro Glu Ala Ile Ala Lys Thr Val Val Pro Asp Arg Met Gly  
 260 265 270  
 Ser Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp  
 20 275 280 285  
 Thr Leu Leu Ala Leu Pro Leu Leu Pro Ser His Asn Arg Phe Leu Thr  
 290 295 300  
 Leu Asp Ala Ile His Gln Asn Ile Gly Pro Leu Leu Leu Ala Val Ser  
 305 310 315 320  
 25 Ser Ala Thr Gly Ile Thr Gln Phe Ile Leu Thr Ala Thr Val Pro Gly  
 325 330 335  
 Trp Thr Ile Ile Ile Ile Ala Ser Met Thr Met Val Arg Cys Ser Val  
 340 345 350  
 Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Gln Ile Arg Phe Leu Ala Phe Ser Leu His  
 30 355 360 365  
 Thr Leu Ile Asn Leu Phe Met Leu Ile Pro Leu Lys Gly Phe Ala Leu  
 370 375 380

Leu Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Gly Ser Thr Thr Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Pro Ala Ile Ala Glu Ser Asn Ala Ala Ser Asn Glu Ala Glu Ile  
 405 410 415  
 5 Val Ala Ser Ala Ser Pro Phe Gly Gly Gly Thr Ser Trp Arg Phe Arg  
 420 425 430  
 Arg  
 <210> 4  
 10 <211> 424  
 <212> PRT  
 <213> Rhizobium leguminosarum  
 <400> 4  
 Met Thr Leu Leu Ala Thr Thr Ser Ile Ala Ala Ile Ser Leu Tyr Ala  
 15 1 5 10 15  
 Met Leu Ser Thr Val Tyr Lys Ser Ala Gln Val Phe His Ala Arg Arg  
 20 25 30  
 Thr Thr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Asp Ile Glu Thr Asn Pro Val  
 35 40 45  
 20 Pro Ser Val Asp Val Ile Val Pro Cys Phe Asn Glu Asp Pro Ile Val  
 50 55 60  
 Leu Ser Glu Cys Leu Ala Ser Leu Ala Glu Gln Asp Tyr Ala Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Ile Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Lys Asn Arg Asp Ala Val  
 25 85 90 95  
 Val Ala Gln Arg Ala Ala Tyr Ala Asp Asp Glu Arg Phe Asn Phe Thr  
 100 105 110  
 Ile Leu Pro Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Ile Ala Ala Ile Thr  
 115 120 125  
 30 Gln Ser Ser Gly Asp Leu Ile Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Thr Ile  
 130 135 140  
 Ala Pro Asp Val Val Ser Lys Leu Ala His Lys Met Arg Asp Pro Ala

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
|    | Val Gly Ala Ala Met Gly Gln Met Lys Ala Ser Asn Gln Ala Asp Thr |     |     |     |
|    |                                                                 | 165 | 170 | 175 |
|    | Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn Glu |     |     |     |
| 5  |                                                                 | 180 | 185 | 190 |
|    | Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys Gly |     |     |     |
|    |                                                                 | 195 | 200 | 205 |
|    | Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Met Leu Ser Leu Leu Asp Gln |     |     |     |
|    |                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| 10 | Tyr Glu Thr Gln Leu Tyr Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu Asp |     |     |     |
|    |                                                                 | 225 | 230 | 235 |
|    | Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Ser Ala Gly Phe Arg Thr Glu Tyr |     |     |     |
|    |                                                                 | 245 | 250 | 255 |
|    | Val Pro Ser Ala Ile Ala Ala Thr Val Val Pro Asp Thr Met Gly Val |     |     |     |
| 15 |                                                                 | 260 | 265 | 270 |
|    | Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp Thr |     |     |     |
|    |                                                                 | 275 | 280 | 285 |
|    | Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Pro Gly Leu Asp Arg Tyr Leu Thr Leu |     |     |     |
|    |                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| 20 | Asp Ala Ile Gly Gln Asn Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ser Val |     |     |     |
|    |                                                                 | 305 | 310 | 315 |
|    | Leu Thr Gly Ile Gly Gln Phe Ala Leu Thr Ala Thr Leu Pro Trp Trp |     |     |     |
|    |                                                                 | 325 | 330 | 335 |
|    | Thr Ile Leu Val Ile Gly Ser Met Thr Leu Val Arg Cys Ser Val Ala |     |     |     |
| 25 |                                                                 | 340 | 345 | 350 |
|    | Ala Tyr Arg Ala Arg Glu Leu Arg Phe Leu Gly Phe Ala Leu His Thr |     |     |     |
|    |                                                                 | 355 | 360 | 365 |
|    | Leu Val Asn Ile Phe Leu Leu Ile Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu Cys |     |     |     |
|    |                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| 30 | Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Gly Ser Val Ala Ile Ala |     |     |     |
|    |                                                                 | 385 | 390 | 395 |
|    | Pro Thr Val Gly Gln Gln Gly Ala Thr Lys Met Pro Gly Arg Ala Thr |     |     | 400 |

405 410 415  
 Ser Glu Ile Ala Tyr Ser Gly Glu  
 420  
 <210> 5  
 5 <211> 426  
 <212> PRT  
 <213> Rhizobium meliloti  
 <400> 5  
 Met Tyr Leu Leu Asp Thr Thr Ser Thr Ala Ala Ile Ser Ile Tyr Ala  
 10 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Thr Ala Tyr Arg Ser Met Gln Val Leu Tyr Ala Arg Pro  
 20 25 30  
 Ile Asp Gly Pro Ala Val Ala Ala Glu Pro Val Glu Thr Arg Pro Leu  
 35 40 45  
 15 Pro Ala Val Asp Val Ile Val Pro Ser Phe Asn Glu Asp Pro Gly Ile  
 50 55 60  
 Leu Ser Ala Cys Leu Ala Ser Ile Ala Asp Gln Asp Tyr Pro Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Arg Asn Arg Glu Ala Ile  
 20 85 90 95  
 Val Arg Val Arg Ala Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Arg Phe Ser Phe Ile  
 100 105 110  
 Leu Leu Pro Glu Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile  
 115 120 125  
 25 Gly Gln Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Ser Thr  
 130 135 140  
 Ile Ala Phe Asp Val Val Ser Lys Leu Ala Ser Lys Met Arg Asp Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Val Gly Ala Val Met Gly Gln Leu Thr Ala Ser Asn Ser Gly Asp  
 30 165 170 175  
 Thr Trp Leu Thr Lys Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn  
 180 185 190

Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ser Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys  
 195 200 205  
 Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Ala Ser Leu Leu Asp  
 210 215 220  
 5 Gln Tyr Glu Thr Gln Leu Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu  
 245 250 255  
 Tyr Val Pro Asp Ala Ile Val Ala Thr Val Val Pro Asp Thr Leu Lys  
 10 260 265 270  
 Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp  
 275 280 285  
 Thr Phe Leu Ala Leu Pro Leu Leu Arg Gly Leu Ser Pro Phe Leu Ala  
 290 295 300  
 15 Phe Asp Ala Val Gly Gln Asn Ile Gly Gln Leu Leu Leu Ala Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Val Val Thr Gly Leu Ala His Leu Ile Met Thr Ala Thr Val Pro Trp  
 325 330 335  
 Trp Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys Met Thr Ile Ile Arg Cys Ser Val  
 20 340 345 350  
 Val Ala Leu His Ala Arg Gln Leu Arg Phe Leu Gly Phe Val Leu His  
 355 360 365  
 Thr Pro Ile Asn Leu Phe Leu Ile Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu  
 370 375 380  
 25 Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Tyr Ser Ala Pro Glu  
 385 390 395 400  
 Val Pro Val Ser Gly Gly Lys Gln Thr Pro Ile Gln Thr Ser Gly Arg  
 405 410 415  
 Val Thr Pro Asp Cys Thr Cys Ser Gly Glu  
 30 420 425  
 <210> 6  
 <211> 452

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rhizobium tropici

&lt;400&gt; 6

Met Asn Leu Leu Asp Ala Thr Ser Thr Ala Ala Ile Ser Leu Tyr Ala

5 1 5 10 15

Met Leu Ser Thr Ala Tyr Lys Ser Met Gln Val Val Tyr Ala Arg Pro

20 25 30

Ile Glu Glu Pro Ser Thr Ser Ala Glu Pro Ile Ala Ser Ala Gln Trp

35 40 45

10 Pro Ser Val Asp Val Ile Ile Pro Ser Phe Asn Glu Asp Pro Gly Thr

50 55 60

Leu Trp Asp Cys Leu Glu Ser Ile Ala His Glu Glu Tyr Ala Gly Asp

65 70 75 80

Leu Asn Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Ser Asn Arg Asp Ala Ile

15 85 90 95

Thr Pro Val His Thr Ala Phe Ala Arg Asp Pro Arg Phe Thr Phe Ile

100 105 110

Leu Leu Arg Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile

115 120 125

20 Arg Arg Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile

130 135 140

Leu Ala Pro Asp Val Val Val Lys Leu Ala Leu Lys Met Gln Asp Pro

145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Ala Ala Ser Asn Arg His Glu

25 165 170 175

Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn

180 185 190

Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys

195 200 205

30 Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Thr Ala Leu Thr Met Leu Leu Asp

210 215 220

Gln Tyr Glu Thr Gln Met Phe Arg Gly Lys Arg Ser Asp Phe Gly Glu

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
|    | Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu |     |     |     |
|    | 245                                                             | 250 | 255 |     |
|    | Tyr Val Pro Thr Ala Ile Ala Ala Thr Val Val Pro Asn Lys Leu Arg |     |     |     |
| 5  | 260                                                             | 265 | 270 |     |
|    | Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp |     |     |     |
|    | 275                                                             | 280 | 285 |     |
|    | Thr Leu Leu Ala Met Asn Leu Leu Pro Gly Leu Asp Arg Phe Leu Thr |     |     |     |
|    | 290                                                             | 295 | 300 |     |
| 10 | Leu Asp Val Ile Gly Gln Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ser |     |     |     |
|    | 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
|    | Val Leu Thr Gly Leu Ala Gln Phe Ala Leu Thr Gly Thr Val Pro Trp |     |     |     |
|    | 325                                                             | 330 | 335 |     |
|    | Trp Thr Cys Leu Met Ile Ala Ser Met Thr Met Ile Arg Cys Ser Val |     |     |     |
| 15 | 340                                                             | 345 | 350 |     |
|    | Ala Ala Val Arg Ala Arg Gln Phe Arg Phe Ile Gly Phe Ser Leu His |     |     |     |
|    | 355                                                             | 360 | 365 |     |
|    | Thr Phe Ile Asn Ile Phe Phe Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu |     |     |     |
|    | 370                                                             | 375 | 380 |     |
| 20 | Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Gly Ser Ala Ala Lys |     |     |     |
|    | 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
|    | Ala Thr Gly Lys Gly Gly Lys Leu Asp Ala Ile Gln Asp Pro Val Ala |     |     |     |
|    | 405                                                             | 410 | 415 |     |
|    | Ala Ser Ser Pro Arg Glu Ser Gln Glu Asn Glu Ala Pro Leu Arg Arg |     |     |     |
| 25 | 420                                                             | 425 | 430 |     |
|    | His Asn Leu Ala Arg Asp Ala Thr Arg Ser Met Ala Tyr Asp Gly Ile |     |     |     |
|    | 435                                                             | 440 | 445 |     |
|    | Cys Thr Asp Gln                                                 |     |     |     |
|    | 450                                                             |     |     |     |
| 30 | <210>                                                           | 7   |     |     |
|    | <211>                                                           | 428 |     |     |
|    | <212>                                                           | PRT |     |     |

<213> Rhizobium leguminosarum

<400> 7

```

Met Thr Met Leu Asp Thr Thr Ser Thr Val Ala Val Ser Leu Tyr Ala
1           5           10           15
5  Leu Leu Ser Thr Ala Tyr Lys Ser Met Gln Ala Val Tyr Ser Leu Pro
    20           25           30
Thr Asp Val Ser Leu Ala Ser His Gly Leu Gly Gly Phe Asp Glu Leu
    35           40           45
Pro Ser Val Asp Val Ile Val Pro Ser Phe Asn Glu Asp Pro Arg Thr
10  50           55           60
Leu Ser Glu Cys Leu Ala Ser Ile Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Arg
65           70           75           80
Leu Gln Val Tyr Leu Val Asp Asp Gly Ser Glu Asn Arg Glu Ala Leu
    85           90           95
15 Arg Leu Val His Glu Ala Phe Ala Arg Asp Pro Arg Phe Asn Ile Leu
    100           105           110
Leu Leu Pro Gln Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Asp Arg Cys Asp
    115           120           125
Gln Arg Ser Ala Gly Asp Met Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile
20  130           135           140
Leu Ala Ser Asp Val Ile Arg Lys Leu Val Pro Lys Asn Ala Arg Val
145           150           155           160
Ala Val Gly Arg Met Gly Gln Leu Thr Gly Pro Gln Pro Lys Arg Gln
    165           170           175
25 Leu Ala Asp Pro Phe Asp Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn Glu
    180           185           190
Glu Arg Ser Gln Gln Ala Arg Phe Gly Cys Val Met Phe Cys Ser Gly
    195           200           205
Ser Cys Val Met Tyr Arg Leu Val Ser Ala Ser Leu Leu Asp Gln Tyr
30  210           215           220
Asp Ala Gln Tyr Phe Arg Lys Gln Arg Phe Gly Glu Ile Asp Ile His
225           230           235           240

```

Leu Ser His Ala Glu Gly Ser Phe Arg Thr Glu Tyr Arg Pro Ser Ala  
 245 250 255  
 His Ala Ala Thr Val Val Pro Asn Lys Leu Gly Pro Tyr Leu Gly Gln  
 260 265 270  
 5 Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Thr Thr Leu Leu Gly Ala  
 275 280 285  
 Pro Leu Pro Asn Leu Asn Arg Phe Leu Met Leu Asp Val Val Gly Gln  
 290 295 300  
 Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Asp His Ser Val Leu Thr Gly Leu Ala  
 10 305 310 315 320  
 Gln Leu Ala Leu Thr Gly Thr Ala Pro Trp Leu Ala Ala Leu Met Ile  
 325 330 335  
 Val Ala Met Thr Ile Asp Arg Cys Ser Val Val Ala Leu Arg Ala Arg  
 340 345 350  
 15 Gln Leu Arg Phe Leu Gly Phe Ser Leu His Thr Phe Ile Asn Ile Phe  
 355 360 365  
 Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu Cys Thr Leu Ser Asn Ile  
 370 375 380  
 Ala Trp Leu Ser Ser Leu Leu Cys Trp Gln Leu Glu Ser Thr Ser Thr  
 20 385 390 395 400  
 Ala Asp Ala Arg Thr Thr Glu Cys Ser Asp Met Arg Thr Ala Ser Lys  
 405 410 415  
 Leu Ser Pro Pro Pro Ser Cys Gln Ala Asn Asp Val  
 420 425  
 25 <210> 8  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Rhizobium sp.  
 <400> 8  
 30 Met Asp Leu Leu Thr Thr Thr Ser Thr Val Ala Val Ala Cys Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ser Thr Val Tyr Lys Gly Met Gln Ala Val Tyr Ser Leu Pro

|    |                                                                 |                                                 |         |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------|
|    | 20                                                              | 25                                              | 30      |
|    | Pro Thr Val Ala                                                 | Pro Ala Ser Glu Asp Leu Val Gly Ser Asp Leu Trp |         |
|    | 35                                                              | 40                                              | 45      |
|    | Pro Ser Val Asp Val Ile Ile Pro Cys Tyr Asn Glu Gly Pro Leu Thr |                                                 |         |
| 5  | 50                                                              | 55                                              | 60      |
|    | Leu Ser Ala Cys Leu Asp Ser Ile Ala Asn Gln Glu Tyr Ala Gly Lys |                                                 |         |
|    | 65                                                              | 70                                              | 75 80   |
|    | Leu Arg Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Gly Asn Arg Asp Ala Val |                                                 |         |
|    | 85                                                              | 90                                              | 95      |
| 10 | Ile Pro Ile His Asp Asn Tyr Ala Gly Asp Pro Arg Phe Asp Phe Ile |                                                 |         |
|    | 100                                                             | 105                                             | 110     |
|    | Leu Leu Pro Glu Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile |                                                 |         |
|    | 115                                                             | 120                                             | 125     |
|    | Arg Arg Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Thr |                                                 |         |
| 15 | 130                                                             | 135                                             | 140     |
|    | Leu Ala Ser Asp Val Ile Arg Lys Leu Ala Arg Lys Met Gln Asp Pro |                                                 |         |
|    | 145                                                             | 150                                             | 155 160 |
|    | Ala Ile Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Thr Ala Ser Asn Arg Ser Asp |                                                 |         |
|    | 165                                                             | 170                                             | 175     |
| 20 | Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn |                                                 |         |
|    | 180                                                             | 185                                             | 190     |
|    | Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys |                                                 |         |
|    | 195                                                             | 200                                             | 205     |
|    | Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ser Leu Leu Ser Leu Leu Asp |                                                 |         |
| 25 | 210                                                             | 215                                             | 220     |
|    | Gln Tyr Glu Thr Gln Met Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu |                                                 |         |
|    | 225                                                             | 230                                             | 235 240 |
|    | Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Glu Ala Gly Phe Arg Thr Glu |                                                 |         |
|    | 245                                                             | 250                                             | 255     |
| 30 | Tyr Val Pro Asp Ala Ile Ala Val Thr Val Val Pro Asp Arg Leu Gly |                                                 |         |
|    | 260                                                             | 265                                             | 270     |
|    | Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp |                                                 |         |

|    |                                                                 |     |         |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
|    | 275                                                             | 280 | 285     |
|    | Thr Leu Leu Ala Leu Arg Leu Leu Pro Gly Leu Asp Arg Tyr Leu Thr |     |         |
|    | 290                                                             | 295 | 300     |
|    | Leu Asp Val Val Gly Gln Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ser |     |         |
| 5  | 305                                                             | 310 | 315 320 |
|    | Val Ile Ala Gly Ile Ala Gln Phe Ala Leu Thr Ala Thr Leu Pro Trp |     |         |
|    | 325                                                             | 330 | 335     |
|    | Pro Thr Ile Leu Val Ile Ala Ala Met Thr Ile Ile Arg Cys Thr Val |     |         |
|    | 340                                                             | 345 | 350     |
| 10 | Thr Ala Cys Arg Ala Arg Gln Ala Arg Phe Ile Gly Phe Ser Leu His |     |         |
|    | 355                                                             | 360 | 365     |
|    | Thr Phe Ile Asn Ile Phe Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu |     |         |
|    | 370                                                             | 375 | 380     |
|    | Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Lys Thr Ala Thr Leu |     |         |
| 15 | 385                                                             | 390 | 395 400 |
|    | Pro Asn Ala Asp Lys Lys Gln Ile Ile Val Ala Asn Pro Ile Ala Gly |     |         |
|    | 405                                                             | 410 | 415     |
|    | Val Gly Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ala Glu Ala Ile Arg Arg Thr Asp |     |         |
|    | 420                                                             | 425 | 430     |
| 20 | Leu Pro Arg Asp Ser Ser Lys Leu Val Asn Ala Asp Ser Val Cys Ser |     |         |
|    | 435                                                             | 440 | 445     |
|    | Ala Glu                                                         |     |         |
|    | 450                                                             |     |         |
|    | <210> 9                                                         |     |         |
| 25 | <211> 424                                                       |     |         |
|    | <212> PRT                                                       |     |         |
|    | <213> Rhizobium loti                                            |     |         |
|    | <400> 9                                                         |     |         |
|    | Met Asn Leu Phe Ala Ser Ala Ser Thr Val Ala Ile Cys Ser Tyr Ala |     |         |
| 30 | 1                                                               | 5   | 10 15   |
|    | Leu Leu Ser Thr Val Tyr Lys Thr Ala Gln Val Phe Tyr Thr Leu Pro |     |         |
|    | 20                                                              | 25  | 30      |

Thr Asn Val Pro Pro Thr Ser Gly Asp Pro Pro Ser Gly Glu Pro Trp  
 35 40 45  
 Pro Ser Val Asp Val Ile Ile Pro Cys Tyr Asn Glu Ala Pro Arg Thr  
 50 55 60  
 5 Leu Ser Asp Cys Leu Ala Ser Ile Ala Ser Gln Asp Tyr Ala Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Ala Asn Arg Asp Ala Leu  
 85 90 95  
 Val Gly Val His Glu Glu Tyr Ala Gly Asp Pro Arg Phe Asn Phe Val  
 10 100 105 110  
 Ala Leu Pro Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile  
 115 120 125  
 Arg Arg Ser Cys Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile  
 130 135 140  
 15 Leu Ala Pro Asp Val Ile Thr Arg Leu Ala Leu Lys Met Gln Asp Gln  
 145 150 155 160  
 Ala Val Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Ala Ala Ser Asn Arg Ser Glu  
 165 170 175  
 Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn  
 20 180 185 190  
 Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys  
 195 200 205  
 Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asp  
 210 215 220  
 25 Gln Tyr Glu Thr Gln Arg Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu  
 245 250 255  
 Tyr Val Pro Glu Ala Val Ala Ala Thr Val Val Pro Asn Ser Met Gly  
 30 260 265 270  
 Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp  
 275 280 285

Thr Leu Leu Ala Phe Gln Leu Leu Arg Gly Leu Asn Ile Tyr Leu Thr  
 290 295 300  
 Leu Asp Val Ile Gly Gln Asn Ile Gly Pro Leu Leu Ser Leu Ser  
 305 310 315 320  
 5 Ile Leu Ala Gly Leu Ala Gln Phe Val Thr Thr Gly Thr Val Pro Trp  
 325 330 335  
 Thr Ala Cys Leu Met Ile Ala Ala Met Thr Ile Val Arg Cys Ser Val  
 340 345 350  
 Ala Ala Phe Arg Ala Arg Gln Leu Arg Phe Leu Gly Phe Ser Leu His  
 10 355 360 365  
 Thr Leu Ile Asn Ile Phe Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu  
 370 375 380  
 Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Asn  
 385 390 395 400  
 15 Val Gln Asp Thr Gly Asp Ala Leu Pro Lys Pro Asn Leu Val Gly Ser  
 405 410 415  
 Asp Ala Ala Tyr Ser Glu Gln Gln  
 420  
 <210> 10  
 20 <211> 3900  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> T-DNA de pTGK42  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(25)  
 <223> Margem esquerda de T-DNA (complemento)  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (56)..(316)  
 <223> 3' UTR a partir do gene nopalina sintase de T-DNA pTIT37 (com-

- plemento)
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (336)..(887)
- 5 <223> CDS de fosfinotrecina acetil transferase de Streptomyces hygroscopicus (complemento)
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (888)..(1720)
- 10 <223> região promotora do gene CaMV 35S (complemento)
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1172)..(2297)
- <223> região promotora P35S2 do gene CaMV35S
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (2303)..(2359)
- <223> Sequência condutora 5' Cab22L
- <220>
- 20 <221> misc\_feature
- <222> (2369)..(3562)
- <223> região de codificação de A. caulinodans
- <220>
- <221> misc\_feature
- 25 <222> (3575)..(3795)
- <223> terminador 3' 35S
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (3879)..(3855)
- 30 <223> margem direita de T-DNA (sintético) (complemento)
- <400> 10

cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc

60

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atattttgtt  | 120  |
|    | ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaate ataaaaaccc atctcataaa  | 180  |
|    | taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat  | 240  |
|    | gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt  | 300  |
| 5  | tgaacgatct gcttcggatc ctagaacggg tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc  | 360  |
|    | ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacgctc atgccagttc  | 420  |
|    | ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgccctcgtc  | 480  |
|    | atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt  | 540  |
|    | gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccg cgcctggtgg   | 600  |
| 10 | cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag   | 660  |
|    | gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag  | 720  |
|    | cgctcccga gacggacgag gtgcgtccgc cactcctgcy gttcctgcgg ctcggtacgg   | 780  |
|    | aagttgaccg tgcttgcttc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc  | 840  |
|    | gcctcgggtg caccggcgat gtggccggg cgctcgttctg ggtccatggt tatagagaga  | 900  |
| 15 | gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac  | 960  |
|    | ttccttatat agaggaaggg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt   | 1020 |
|    | cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaacg tcttcttttt  | 1080 |
|    | ccacgatgct cctcgtgggt gggggtccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattct  | 1140 |
|    | gaatgatagc ctttcttcta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccctttcta  | 1200 |
| 20 | ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa  | 1260 |
|    | ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat  | 1320 |
|    | ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatgttgac gaagattttc ttcttgatcat | 1380 |
|    | tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgccagtctt caccggcaggt tctgttagat | 1440 |
|    | cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta  | 1500 |
| 25 | gagactcaa tctctattac ttgccttggt ttatgaagca agccttgaat cgtccatact   | 1560 |
|    | ggaatagtac ttctgatctt gagaaatatg tctttctctg tggtcttgat gcaattagtc  | 1620 |
|    | ctgaatcttt tgactgcac tttaaccttc ttgggaagggt atttgatctc ctggagattg  | 1680 |
|    | ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg  | 1740 |
|    | cccgggcata tggcgcgcca tatgcacat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc   | 1800 |
| 30 | taacagaact cgccgtgaag actggcgaa agttcataca gagtctttta cgactcaatg   | 1860 |
|    | acaagaagaa aatcttcgtc aacatgggtg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata  | 1920 |
|    | tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat  | 1980 |

|    |                                                                     |      |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
|    | cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag   | 2040 |
|    | aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag   | 2100 |
|    | atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa   | 2160 |
|    | aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg   | 2220 |
| 5  | taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt   | 2280 |
|    | catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaagaac   | 2340 |
|    | tcttttctct tcttattaaa ccaaaacatc gagtgtcgta gatgtgatcg gtttgcttgc   | 2400 |
|    | gactgcagcc tacgtgacgt tggcgagcgc atacaagggtg gtccagttca ttaacgtgtc  | 2460 |
|    | gagcgtaacg gatgtcgctg gtctcgaaag tgatgctttg ccgctcactc caagggttga   | 2520 |
| 10 | cgttatcgtg ccgacattca atgagaactc cagcacattg ctcgagtgcg tcgcttctat   | 2580 |
|    | atgcgcacaa gactaccgcg gaccaataac gattgtcgtg gtagacgatg ggtcgaccaa   | 2640 |
|    | caaaacatca ttacacgcag tatgcgacaa gtacgcgagc gacgaaaggc tcatatttgc   | 2700 |
|    | cgaacttgat caaaacaagg ggaagcgcgc cgcgcaaagc gaggccatca ggagaacaga   | 2760 |
|    | cggagacctg atactaaacg tagactcgga cacgggtata gataaggatg ttgttataaa   | 2820 |
| 15 | gcttgctgcg tccatgagag ccccgaaatg cgggtggtgc atggggcagc tcgttgcaaa   | 2880 |
|    | gaatcgagaa agatcttggc ttaccagatt aatcgatatg gagtactggc ttgcgtgtaa   | 2940 |
|    | cgaggagcgc attgcgcagt cgaggtttgg ctccgtgatg tgttggttgc ggccgtgcgc   | 3000 |
|    | catgtataga agatctgcaa ttacgccact attggcagaa tatgagcacc agacattcct   | 3060 |
|    | agggcgctcg agcaactttg gtgaggatcg ccatctcaca atcctgatgc tgaaggcggg   | 3120 |
| 20 | atttcggacc gggtagctcc cagggtgccg agcgaggacg ttggttccg atgggctggc    | 3180 |
|    | gccgtacctg cgccagcaac tccgtgggc ccgcagcact tatcgcgaca ccgccctcgc    | 3240 |
|    | cttacgtata aagaaaaatc taagcaaata tatcaccttt gagatatgcg cacagaattt   | 3300 |
|    | gggtacggct ctcttacttg tgatgaccat gatttcgctt tcgctgacta catcagggtc   | 3360 |
|    | gcaaacgccc gttatcattc tgggtgtcgt tgtggggatg tctataataa gatgttgttc   | 3420 |
| 25 | tgtcgccctt atagcgaaag attttcgggt tctatacttc atcgttcact cagcgttgaa   | 3480 |
|    | tggttctaatt ttaacgccgt taaaactcta tgccctgtta accattcggg atagtcgggtg | 3540 |
|    | gctatcacgc gagagttcct aagctagcaa gcttggacac gctgaaatca ccagtctctc   | 3600 |
|    | tctacaaaatc tatctctctc tattttctcc ataataatgt gtgagtagtt ccagataag   | 3660 |
|    | ggaattaggg ttcctatagg gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa cccttagtat   | 3720 |
| 30 | gtattttgtat ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa accaaaatcc  | 3780 |
|    | agtactaaaa tccagatcat gcatggtaca gcggccaatt gccaatccg gggtagcggc    | 3840 |
|    | cgacggccga gtactggcag gatataatcc gttgtaattt gtcgcgtgtg aataagtcgc   | 3900 |

|    |       |                                                                                      |
|----|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <210> | 11                                                                                   |
|    | <211> | 4680                                                                                 |
|    | <212> | DNA                                                                                  |
|    | <213> | Artificial                                                                           |
| 5  | <220> |                                                                                      |
|    | <223> | T-DNA de pTGK44                                                                      |
|    | <220> |                                                                                      |
|    | <221> | misc_feature                                                                         |
|    | <222> | (1)..(25)                                                                            |
| 10 | <223> | Margem esquerda de T-DNA (sintético) (complemento)                                   |
|    | <220> |                                                                                      |
|    | <221> | misc_feature                                                                         |
|    | <222> | (56)..(316)                                                                          |
|    | <223> | 3' UTR a partir do gene nopalina sintase de T-DNA pTIT37 (complemento)               |
| 15 | <220> |                                                                                      |
|    | <221> | misc_feature                                                                         |
|    | <222> | (336)..(887)                                                                         |
|    | <223> | CDS de fosfinotrecina acetil transferase de Streptomyces hygroscopicus (complemento) |
| 20 | <220> |                                                                                      |
|    | <221> | misc_feature                                                                         |
|    | <222> | (888)..(1720)                                                                        |
|    | <223> | região promotora P35S3 do gene CaMV                                                  |
| 25 | <220> |                                                                                      |
|    | <221> | misc_feature                                                                         |
|    | <222> | (1172)..(2297)                                                                       |
|    | <223> | região promotora P35S2 do gene CaMV35S                                               |
|    | <220> |                                                                                      |
| 30 | <221> | misc_feature                                                                         |
|    | <222> | (2303)..(2359)                                                                       |
|    | <223> | Seqüência condutora 5' Cab22L                                                        |

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2369)..(3558)  
 <223> região de codificação de A. caulinodans  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3560)..(4279)  
 <223> EGFP ORF codificando proteína verde fluorescente intensificadora  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (4304)..(4524)  
 <223> terminador 3' 35S  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (4608)..(4584)  
 <223> Margem direita de T-DNA (sintético)  
 <400> 11  
  
 cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgac 60  
 tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atattttgtt 120  
 20 ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaata ataaaaaccc atctcataaa 180  
 taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 240  
 gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt 300  
 tgaacgatct gcttcggatc ctagaacggg tgatctcaga tctcgggtgac gggcaggacc 360  
 ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtc agctgccaga aaccacgctc atgccagttc 420  
 25 ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc 480  
 atgcgcacgc tcgggtcggt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt 540  
 gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccgt ccgctggtgg 600  
 cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag 660  
 gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720  
 30 cgctcccga gacggacgag gtcgtccgct cactcctgcg gttcctgcg ctcggtacgg 780  
 aagttgaccg tgcttgctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840  
 gcctcgggtg cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac  | 960  |
|    | ttccttatat agaggaaggg tcttgcgag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt   | 1020 |
|    | cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaacg tcttcttttt  | 1080 |
|    | ccacgatgct cctcgtgggt gggggtccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattct  | 1140 |
| 5  | gaatgatagc ctttcttcta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tctttttcta  | 1200 |
|    | ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa  | 1260 |
|    | ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat  | 1320 |
|    | ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatgttgac gaagattttc tctttgtcat  | 1380 |
|    | tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgccagtcct caccgagagt tctgttagat  | 1440 |
| 10 | cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta  | 1500 |
|    | gagactccaa tctctattac ttgccttgggt ttatgaagca agccttgaat cgtccatact | 1560 |
|    | ggaatagtag tcttgatctt gagaaatatg tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc  | 1620 |
|    | ctgaatcttt tgactgcac tttaaccttc ttgggaaggt atttgatctc ctggagattg   | 1680 |
|    | ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggcgg ctgtacaggg  | 1740 |
| 15 | cccgggcata tggcgcgcca tatgcacat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc   | 1800 |
|    | taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gactctttta cgactcaatg  | 1860 |
|    | acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata  | 1920 |
|    | tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat  | 1980 |
|    | cgggaaacct cctcgatttc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag  | 2040 |
| 20 | aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag  | 2100 |
|    | atgcctctgc cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc caccgaggagc atcgtggaaa | 2160 |
|    | aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg  | 2220 |
|    | taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata taaggaagtt  | 2280 |
|    | catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaagaac  | 2340 |
| 25 | tcttttctct tcttattaaa ccaaaacat gagtgctgta gatgtgatcg gtttgcttgc   | 2400 |
|    | gactgcagcc tacgtgacgt tggcgagcgc atacaagggtg gtccagttca ttaacgtgct | 2460 |
|    | gagcgtaacg gatgtcgtg gtctcgaaag tgatgctttg ccgctcactc caagggttga   | 2520 |
|    | cgttatcgtg ccgacattca atgagaactc cagcacattg ctcgagtgcg tcgcttctat  | 2580 |
|    | atgcgcacaa gactaccgcg gaccaataac gattgtcgtg gtagacgatg ggtcgaccaa  | 2640 |
| 30 | caaaacatca tttcacgcag tatgcgacaa gtacgcgagc gacgaaagg tcatatttgt   | 2700 |
|    | cgaacttgat caaaacaagg ggaagcgcgc cgcgcaaattg gaggccatca ggagaacaga | 2760 |
|    | cggagacctg atactaaacg tagactcgga cacggttata gataaggatg ttgttacaaa  | 2820 |

|    |                                                                       |      |
|----|-----------------------------------------------------------------------|------|
|    | gcttgcgctcg tccatgagag ccccgaaatgt cgggtggtgtc atgggggcagc tcgttgcaaa | 2880 |
|    | gaatcgagaa agatcttggc ttaccagatt aatcgatatg gagtactggc ttgctgttaa     | 2940 |
|    | cgaggagcgc attgcgcagt cgaggtttgg ctccgtgatg tgttggtgtg ggccgtgcgc     | 3000 |
|    | catgtataga agatctgcaa ttacgccact attggcagaa tatgagcacc agacattcct     | 3060 |
| 5  | agggcgctccg agcaactttg gtgaggatcg ccatctcaca atcctgatgc tgaaggcggg    | 3120 |
|    | atttcggacc gggtagctcc caggtgccgt agcgaggacg ttggttcggg atgggctggc     | 3180 |
|    | gccgtacctg cgccagcaac tccgctgggc ccgcagcact tatcgcgaca ccgccctcgc     | 3240 |
|    | cttacgtata aagaaaaatc taagcaaata tatcaccttt gagatatgcg cacagaattt     | 3300 |
|    | gggtacggct ctcttacttg tgatgaccat gatttcgctt tcgctgacta catcagggtc     | 3360 |
| 10 | gcaaacgccc gttatcattc tgggtgtcgt tgtggggatg tctataataa gatgttggtc     | 3420 |
|    | tgtcgccctt atagcgaaag attttcgggt tctatacttc atcgttcact cagcgttgaa     | 3480 |
|    | tgttctaatt ttaacgccgt taaaactcta tgccctgtta accattcggg atagtcggtg     | 3540 |
|    | gctatcacgc gagagttcca tgggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgc    | 3600 |
|    | catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cgccacaaag ttcagcgtgt ccggcgaggg     | 3660 |
| 15 | cgaggcgcat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct     | 3720 |
|    | gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg     | 3780 |
|    | ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt     | 3840 |
|    | ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgagggtgaa     | 3900 |
|    | gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga      | 3960 |
| 20 | cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat     | 4020 |
|    | ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga     | 4080 |
|    | cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt     | 4140 |
|    | gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtcgcc ctgagcaaag accccaacga      | 4200 |
|    | gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat     | 4260 |
| 25 | ggacgagctg tacaagtaaa gcggccgcga ctctagcaag cttggacacg ctgaaatcac     | 4320 |
|    | cagtctctct ctacaaatct atctctctct attttctcca taataatgtg tgagtagttc     | 4380 |
|    | ccagataagg gaattagggg tcctataggg ttctgctcat gtgttgagca tataagaaac     | 4440 |
|    | ccttagtatg tatttgattt tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa     | 4500 |
|    | ccaaaatcca gtactaaaat ccagatcatg catggtacag cggccaattg ccaattccgg     | 4560 |
| 30 | ggtaccggtc gacggccgag tactggcagg atatataccg ttgtaatttg tcgcgtgtga     | 4620 |
|    | ataagtcgct gtgtatgttt gtttgattgt ttctgttgga gtgcagccca tttcaccgga     | 4680 |

|    |       |                                                                                                               |
|----|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <211> | 5490                                                                                                          |
|    | <212> | DNA                                                                                                           |
|    | <213> | Artificial                                                                                                    |
|    | <220> |                                                                                                               |
| 5  | <223> | T-DNA de pTDBI5                                                                                               |
|    | <220> |                                                                                                               |
|    | <221> | misc_feature                                                                                                  |
|    | <222> | (1)..(25)                                                                                                     |
|    | <223> | Margem esquerda de T-DNA (complemento)                                                                        |
| 10 | <220> |                                                                                                               |
|    | <221> | misc_feature                                                                                                  |
|    | <222> | (56)..(316)                                                                                                   |
|    | <223> | 3' nos: 3' UTR a partir do gene nopalina sintase de T-DNA pTIT37<br>(complemento)                             |
| 15 | <220> |                                                                                                               |
|    | <221> | misc_feature                                                                                                  |
|    | <222> | (887)..(336)                                                                                                  |
|    | <223> | bar: sequência codificada de fosfinotrecina acetil transferase<br>de Streptomyces hygroscopicus (complemento) |
| 20 | <220> |                                                                                                               |
|    | <221> | misc_feature                                                                                                  |
|    | <222> | (888)..(1720)                                                                                                 |
|    | <223> | P35S3: região promotora do gene CaMV 35S (complemento)                                                        |
|    | <220> |                                                                                                               |
| 25 | <221> | misc_feature                                                                                                  |
|    | <222> | (1796)..(2303)                                                                                                |
|    | <223> | região promotora P35S2 do gene CaMV35S                                                                        |
|    | <220> |                                                                                                               |
|    | <221> | misc_feature                                                                                                  |
| 30 | <222> | (2304)..(2368)                                                                                                |
|    | <223> | 5'cab22L: sequência condutora não-traduzida de gene cab22L de<br>Petunia                                      |

|    |       |                                                                    |     |
|----|-------|--------------------------------------------------------------------|-----|
|    | <220> |                                                                    |     |
|    | <221> | misc_feature                                                       |     |
|    | <222> | (2369)..(3992)                                                     |     |
|    | <223> | chs2exon1: exon 1 de gene quitina sintase 2 de Neurospora crassa   |     |
| 5  | <220> |                                                                    |     |
|    | <221> | misc_feature                                                       |     |
|    | <222> | (3993)..(5203)                                                     |     |
|    | <223> | chs2exon2: exon 2 de gene quitina sintase 2 de Neurospora crassa   |     |
|    | <220> |                                                                    |     |
| 10 | <221> | misc_feature                                                       |     |
|    | <222> | (5205)..(5453)                                                     |     |
|    | <223> | 3'35S: região 3' não-traduzida de gene CaMV35S                     |     |
|    | <220> |                                                                    |     |
|    | <221> | misc_feature                                                       |     |
| 15 | <222> | (5488)..(5512)                                                     |     |
|    | <223> | RB: Margem direita de T-DNA (sintético) (complemento)              |     |
|    | <400> | 12                                                                 |     |
|    |       | cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc  | 60  |
| 20 |       | tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atatcttgtt  | 120 |
|    |       | ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaata ataaaaaccc atctcataaa  | 180 |
|    |       | taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat  | 240 |
|    |       | gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt  | 300 |
|    |       | tgaacgatct gcttcggatc ctagaacgcg tgatctcaga tctcgggtgac gggcaggacc | 360 |
| 25 |       | ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacgtc atgccagttc   | 420 |
|    |       | ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc  | 480 |
|    |       | atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt  | 540 |
|    |       | gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccggt ccgctggtgg | 600 |
|    |       | cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag   | 660 |
| 30 |       | gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag  | 720 |
|    |       | cgctcccgcg gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgcgg ctcggtacgg  | 780 |
|    |       | aagttgaccg tgcttgcttc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc  | 840 |

|    |            |            |            |             |            |            |      |
|----|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
|    | gcctcgggtg | cacggcggat | gtcggccggg | cgctcgttctg | ggtccatggt | tatagagaga | 900  |
|    | gagatagatt | tatagagaga | gactggtgat | ttcagcgtgt  | cctctccaaa | tgaaatgaac | 960  |
|    | ttccttatat | agaggaaggg | tcttgcaag  | gatagtggga  | ttgtgcgtca | tcccttacgt | 1020 |
|    | cagtggagat | gtcacatcaa | tccacttgct | ttgaagacgt  | ggttggaacg | tcttcttttt | 1080 |
| 5  | ccacgatgct | cctcgtgggt | gggggtccat | ctttgggacc  | actgtcggca | gaggcatctt | 1140 |
|    | gaatgatagc | ctttccttta | tcgcaatgat | ggcatttgta  | ggagccacct | tccttttcta | 1200 |
|    | ctgtcctttc | gatgaagtga | cagatagctg | ggcaatggaa  | tccgaggagg | tttcccgaag | 1260 |
|    | ttatcctttg | ttgaaaagtc | tcaatagccc | tttggctctc  | tgagactgta | tctttgacat | 1320 |
|    | ttttggagta | gaccagagt  | tcgtgctcca | ccatgttgac  | gaagattttc | ttcttgtcat | 1380 |
| 10 | tgagtcgtaa | aagactctgt | atgaactggt | cgccagtctt  | cacggcgagt | tctgttagat | 1440 |
|    | cctcgatttg | aatcttagac | tccatgcatg | gccttagatt  | cagtaggaac | taccttttta | 1500 |
|    | gagactccaa | tctctattac | ttgccttggt | ttatgaagca  | agccttgaat | cgccataact | 1560 |
|    | ggaatagtag | ttctgatctt | gagaaatatg | tctttctctg  | tggtcttgat | gcaattagtc | 1620 |
|    | ctgaatcttt | tgactgcac  | tttaaccttc | ttgggaaggt  | atttgatctc | ctggagattg | 1680 |
| 15 | ttactcgggt | agatcgtctt | gatgagacct | gctgcgtagg  | aacgcggccg | ctgtacaggg | 1740 |
|    | cccgggcata | tggcgcgcca | tatgcaccat | acatggagtc  | aaaaattcag | atcgaggatc | 1800 |
|    | taacagaact | cgccgtgaag | actggcgaac | agttcataca  | gagtctttta | cgactcaatg | 1860 |
|    | acaagaagaa | aatcttcgtc | aacatggtgg | agcacgacac  | tctcgtctac | tccaagaata | 1920 |
|    | tcaaagatac | agtctcagaa | gaccaaaggg | ctattgagac  | ttttcaacaa | agggtaatat | 1980 |
| 20 | cgggaaacct | cctcggattc | cattgcccag | ctatctgtca  | cttcatcaaa | aggacagtag | 2040 |
|    | aaaaggaagg | tggcacctac | aaatgccatc | attgcgataa  | aggaaaggct | atcgttcaag | 2100 |
|    | atgcctctgc | cgacagtgg  | cccaaagatg | gacccccacc  | cacgaggagc | atcgtggaaa | 2160 |
|    | aagaagacgt | tccaaccacg | tcttcaaagc | aagtggattg  | atgtgatatc | tccactgacg | 2220 |
|    | taagggatga | cgcacaatcc | cactatcctt | cgcaagaccc  | ttcctctata | taaggaagtt | 2280 |
| 25 | catttcattt | ggagaggact | cgagctcatt | tctctattac  | ttcagccata | acaaaagaac | 2340 |
|    | tcttttctct | tcttattaaa | ccaaaaccat | ggagtccaga  | atcagcaacc | ggttatcgag | 2400 |
|    | ttccgccaca | aggacggtac | gagccttcag | aaatcgatgt  | catgccaggc | cagggacacc | 2460 |
|    | gggatcgagt | tacggaaatg | cgaggcgacc | gcttcctctg  | gcaccagcgc | ctttacacta | 2520 |
|    | caatagccca | agtcgcgcag | cgagtcatta | tccacggtac  | catggagggt | atgcggacga | 2580 |
| 30 | cgtgacagtt | agcatgggac | cggacgacga | tcgtacagat  | atctttggcc | ccgaaaccga | 2640 |
|    | tctcagcgaa | acgcgccacc | tcaacgacgc | atacgggttt  | cggtcatccc | agatcacctt | 2700 |
|    | cagcgaagat | ccccacggca | cccacgcgcg | ttcccggtag  | gacgacgaag | acgatgtgag | 2760 |

|    |            |             |            |             |             |            |      |
|----|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
|    | caccacttat | tccccaaca   | cgggcaccag | cgcttcaggt  | gtcgacaagt  | tcgagcatta | 2820 |
|    | cggtcccatt | cgggaggaag  | gcaagcacga | gcggcgcggc  | gtgcgaccac  | cacagatgtc | 2880 |
|    | gaggaaggaa | gtccagctca  | tcaacggcga | actcgttctc  | gagtgcaaga  | ttccgactat | 2940 |
|    | attgtattcg | tttttgccca  | ggagagacga | agtggagttt  | acgcacatgc  | ggtacacagc | 3000 |
| 5  | cgtcacttgt | gaccctgatg  | actttgttgc | caggggttac  | aagttgcgcc  | agaatatcgg | 3060 |
|    | tcgtaccgcc | agggagacgg  | agctgttcat | ctgcgtgacc  | atgtacaacg  | aggacgagtt | 3120 |
|    | cggattcaca | cggactatgc  | acgcagtcac | gaagaacatt  | tcgcattttt  | gttcccgaaa | 3180 |
|    | caagagtagg | acgtggggag  | cggatgggtg | gcagaagatt  | gtgggtctgtg | tggtttcgga | 3240 |
|    | tggacgagag | atcattcacc  | cccggacctt | ggacgccttc  | gcagccatgg  | gcgtttacca | 3300 |
| 10 | gcacggatc  | gccaaagaact | ttgtcaacca | gaaggcgggtg | caggcccacg  | tttacgagta | 3360 |
|    | cacgacacaa | gtgtctctgg  | acagcgacct | caagttcaag  | ggcgccgaga  | agggcatcgt | 3420 |
|    | gccctgccag | atgatttttt  | gcttgaagga | gaagaaccaa  | aagaaactca  | actcgcatag | 3480 |
|    | atggttcttc | aacgccttgg  | gcaaagcctt | gaaccgcaat  | gtgtgtatcc  | tcctagacgt | 3540 |
|    | cggcacccgc | cccggcgcca  | caagtctcta | ccatctctgg  | aaagccttcg  | acacggattc | 3600 |
| 15 | caacgtggcg | ggggcctgcg  | gggaaatcaa | agcgatgaag  | gggcgggttg  | gcgggaattt | 3660 |
|    | gctcaaccct | ctgggtggcta | gtcagaactt | tgagtacaag  | atgagcaata  | ttctggacaa | 3720 |
|    | accgttggag | tcgggtgttg  | ggtacatcac | ggtgttgccg  | ggcgcttgtg  | cggcgatatc | 3780 |
|    | gtaccatgcg | ctgcagaacg  | atgagacggg | ccatgggccg  | ttgagtcagt  | atttcaaggg | 3840 |
|    | cgagacgctc | catgggcagc  | acgcggatgt | gtttacggcg  | aacatgtact  | tggccgagga | 3900 |
| 20 | ccgaattctg | tggtgggagt  | tggtggccaa | gaggggtgag  | aggtgggtgt  | tgaagtatgt | 3960 |
|    | gaaggggtgt | acgggtgaga  | cggatgtgcc | tgacaccgtc  | ccggaattcg  | tctcgcaacg | 4020 |
|    | tcgtcgttgg | ctcaacggtg  | ccttcttcgc | cgccgtctac  | tcctcgtcc   | actttcgaca | 4080 |
|    | aactctgaaa | accgaccaca  | cctttatgcg | caaagccctt  | ctccacgtcg  | aattcctcta | 4140 |
|    | ccacctcctg | caactcctct  | tcacctactt | ctccctggcc  | aacttctacc  | tcgccttcta | 4200 |
| 25 | ctttatcgcc | ggcgggtctcg | ccgateccca | cgtcgacctt  | tttaactcgg  | acggccacgt | 4260 |
|    | cgcgcgcac  | atcttcaaca  | tctccgcta  | cgtctgcgtc  | ctgctgatct  | gcacacaatt | 4320 |
|    | catcttgtcc | ctcggcaacc  | gtccgcaggg | tgccaaaaga  | atgtatctcg  | catccatgat | 4380 |
|    | catctacgcc | gtcatcatgg  | tgtacaccac | cttcgccacc  | atcttcatcg  | tcgtgcgaca | 4440 |
|    | aatccaaccc | tctcaaaaat  | ccgacgacaa | gcccgacctc  | gaactcggca  | acaacgtctt | 4500 |
| 30 | caccaacctg | atcgtctccg  | tggctagtac | cctcgggctc  | tacttcgtca  | tgctctttct | 4560 |
|    | ctatctcgac | ccctggcaca  | tggtcacctc | ggccatccag  | tactttgtcc  | tgctgccttc | 4620 |
|    | ctacatctgc | acgtccaga   | tctacgcctt | ttgcaacacc  | cacgacgtca  | catggggcac | 4680 |

|    |                                                                        |      |
|----|------------------------------------------------------------------------|------|
|    | caaaggcgac aacgtgatgc gcaccgatct cggaggcgcc attggcaagg gaagcaccgt      | 4740 |
|    | cgaactggaa atgccttcgg accaactcga catcgactcg ggatacgacg aatgtctacg      | 4800 |
|    | taatctccgc gatcgcgta tggtcctgc cgttcccggtg tccgaggacc agctgcagca       | 4860 |
|    | ggattactac aagtcggtgc gcacgtacat ggtgggtgtcg tggatggtgg ccaacgcgac     | 4920 |
| 5  | gctggccatg gcggtctcgg aagcgtatgg cgattcggaa attggggata atttttactt      | 4980 |
|    | gcggtttatc ctgtgggagg tggcgccctt ggcgctgttt agagcggttg ggtcgacgac      | 5040 |
|    | gtttgcggcg attaactctg tgagtgtctt cgtggagggc agggtcaggc tgaggttgaa      | 5100 |
|    | tatgaaaggg tttaggtgga ttaaggagaa gtggggggat gcggatgtga agggcaagtt      | 5160 |
|    | tgaggggttg ggggatcggg cgaggggggtt ggcgaggcgg tgagctagca agcttgga       | 5220 |
| 10 | cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctct ctattttctc cataataatg      | 5280 |
|    | tgtgagtagt tcccagataa gggaattagg gttcctatag ggtttcgctc atgtgttgag      | 5340 |
|    | catataagaa acccttagta tgtatttgta tttgtaaaat acttctatca ataaaatttc      | 5400 |
|    | taattcctaa aacccaaatc cagtactaaa atccagatca tgcatggtac agcggccaat      | 5460 |
|    | tccgggggtac ggtcgacggc cgagtactgg                                      | 5490 |
| 15 | <210> 13                                                               |      |
|    | <211> 5606                                                             |      |
|    | <212> DNA                                                              |      |
|    | <213> Artificial                                                       |      |
|    | <220>                                                                  |      |
| 20 | <223> T-DNA de ppTDBI37                                                |      |
|    | <220>                                                                  |      |
|    | <221> misc_feature                                                     |      |
|    | <222> (1)..(25)                                                        |      |
|    | <223> Margem esquerda de T-DNA (complemento)                           |      |
| 25 | <220>                                                                  |      |
|    | <221> misc_feature                                                     |      |
|    | <222> (56)..(316)                                                      |      |
|    | <223> 3' nos: 3' UTR a partir do gene nopalina sintase de T-DNA pTIT37 |      |
|    | (complemento)                                                          |      |
| 30 | <220>                                                                  |      |
|    | <221> misc_feature                                                     |      |
|    | <222> (336)..(887)                                                     |      |

<223> bar: sequência codificada de fosfinotrecina acetil transferase  
 de Streptomyces hygroscopicus (complemento)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (888)..(1720)  
 <223> P35S3: região promotora do gene CaMV 35S transcrita (complemen-  
 to)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1769)..(2303)  
 <223> P35S2: região promotora P35S2 do gene CaMV35S  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2304)..(2368)  
 15 <223> 5'cab22L: sequência condutora de gene cab22L de Petunia  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2373)..(2477)  
 <223> XylT: sinal de marcação Golgi a partir da proteína beta 1,2-  
 20 xilosiltransferase  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2487)..(5321)  
 <223> código de região quitina sintase 2 de Neurospora crassa (exon 1  
 25 e exon 2)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5323)..(5571)  
 <223> 3'35S: 3' UTR fragment of the CaMV 35S transcript  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5630)..(5606)

|       |  |                                                                    |      |
|-------|--|--------------------------------------------------------------------|------|
| <223> |  | RB: Margem direita de T-DNA (sintético) (complemento)              |      |
| <400> |  | 13                                                                 |      |
|       |  | cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc  | 60   |
|       |  | tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atatcttctgt | 120  |
| 5     |  | ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaate ataaaaaccc atctcataaa  | 180  |
|       |  | taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat  | 240  |
|       |  | gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt  | 300  |
|       |  | tgaacgatct gcttcggatc ctagaacgcg tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc  | 360  |
|       |  | ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacgctc atgccagttc  | 420  |
| 10    |  | ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc  | 480  |
|       |  | atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt  | 540  |
|       |  | gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccggt ccgctgggtg | 600  |
|       |  | cggggggaga cgtaacaggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag   | 660  |
|       |  | gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag  | 720  |
| 15    |  | cgctcccga gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgcgg ctccggtacgg  | 780  |
|       |  | aagttgaccg tgcttgtctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc  | 840  |
|       |  | gcctcgggtg cagggcggat gtcggccggg cgctcgttctg ggtccatggt tatagagaga | 900  |
|       |  | gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac  | 960  |
|       |  | ttccttatat agaggaaggg tcttgccaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt  | 1020 |
| 20    |  | cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaacg tcttcttttt  | 1080 |
|       |  | ccacgatgct cctcgtgggt gggggtccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattct  | 1140 |
|       |  | gaatgatagc ctttccttta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccctttcta  | 1200 |
|       |  | ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa  | 1260 |
|       |  | ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat  | 1320 |
| 25    |  | ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatgttgac gaagattttc ttcttctcat  | 1380 |
|       |  | tgagtctgaa aagactctgt atgaactgtt cgccagtcct cagggcgagt tctgttagat  | 1440 |
|       |  | cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta  | 1500 |
|       |  | gagactccaa tctctattac ttgccttggt ttatgaagca agccttgaat cgtccatact  | 1560 |
|       |  | ggaatagtag ttctgatctt gagaaatatg tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc  | 1620 |
| 30    |  | ctgaatcttt tgactgcac ttttaacctc ttgggaaggt atttgatctc ctggagattg   | 1680 |
|       |  | ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg  | 1740 |
|       |  | cccgggcata tggcgcgcca tatgcacat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc   | 1800 |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg  | 1860 |
|    | acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata  | 1920 |
|    | tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat  | 1980 |
|    | cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag  | 2040 |
| 5  | aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag  | 2100 |
|    | atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa  | 2160 |
|    | aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg  | 2220 |
|    | taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata taaggaagtt  | 2280 |
|    | catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaagaac  | 2340 |
| 10 | tcttttctct tcttattaaa ccaaaacat ggatgagtaa acggaatccg aagattctga   | 2400 |
|    | agatttttct gtatatgtta cttctcaact ctctctttct catcatctac ttcgtttttc  | 2460 |
|    | actcatcgtc gttttcagcc aaaaccatgg agtcacgaat cagcaaccgg ttatcgagtt  | 2520 |
|    | ccgccacaag gacggtacga gccttcagaa atcgatgtca tgccaggcca gggacaccgg  | 2580 |
|    | gatcgagtta cggaaatgcg aggcgaccgc ttccctcggc accagcgctt ttacactaca  | 2640 |
| 15 | atagcccaag tcgcgacgag agtcattatc cacggtacca tggaggttat gcgacgacg   | 2700 |
|    | tgacagttag catgggaccg gacgacgac gtacagatat ctttggtccc gaaaccgatc   | 2760 |
|    | tcagcgaaac ggcgccctc aacgacgcat acgggtttcg gtcacccag atcacctca     | 2820 |
|    | gcgaagatcc ccacggcacc cacgcgcgtt cccggtacga cgacgaagac gatgtgagca  | 2880 |
|    | ccacttatcc ctccaacacg ggcaccagcg cttcaggtgt cgacaagttc gagcattacg  | 2940 |
| 20 | gtcccatcc ggaggaaggc aagcacgagc ggcgcggcgt gcgaccacca cagatgtcga   | 3000 |
|    | ggaaggaagt ccagctcatc aacggcgaac tcgttctcga gtgcaagatt ccgactatat  | 3060 |
|    | tgtattcgtt tttgccagg agagacgaag tggagtttac gcacatgcg tacacagccg    | 3120 |
|    | tcacttgtga ccctgatgac tttgttgcca ggggttaciaa gttgcgccag aatatcggtc | 3180 |
|    | gtaccgccag ggagacggag ctgttcatct gcgtgaccat gtacaacgag gacgagttcg  | 3240 |
| 25 | gattcacacg gactatgcac gcagtcataa agaacatttc gcatttttgt tccgaaaca   | 3300 |
|    | agagtaggac gtggggagcg gatgggtggc agaagattgt ggtctgtgtg gtttcggatg  | 3360 |
|    | gacgagagat cattcacccc cggaccttgg acgcctcgc agccatgggc gtttaccagc   | 3420 |
|    | acggtatcgc caagaacttt gtcaaccaga aggcggtgca ggcccacgtt tacgagtaca  | 3480 |
|    | cgacacaagt gtctctggac agcgacctca agttcaaggc cgccgagaag ggcacgtgc   | 3540 |
| 30 | cctgccagat gattttttgc ttgaaggaga agaaccaaaa gaaactcaac tcgcatagat  | 3600 |
|    | ggttcttcaa cgcctttggc aaagccttga acccgatgt gtgtatctc ctagacgtcg    | 3660 |
|    | gcacccgccc cggcggcaca agtctctacc atctctggaa agccttcgac acggattcca  | 3720 |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | acgtggcggg ggcctgcggg gaaatcaaag cgatgaaggg gcggtttggc gggaatttgc  | 3780 |
|    | tcaacctctt ggtggctagt cagaactttg agtacaagat gagcaatatt ctggacaaac  | 3840 |
|    | cgttggagtc ggtgtttggg tacatcacgg tgttgccggg cgccttgctg gcgtatcgg   | 3900 |
|    | accatgcgct gcagaacgat gagacgggcc atggggcgtt gagtcagtat ttcaagggcg  | 3960 |
| 5  | agacgctcca tgggcagcac gcggatgtgt ttacggcgaa catgtacttg gccgaggacc  | 4020 |
|    | gaattctgtg ttgggagttg gtggccaaga ggggtgagag gtgggtgttg aagtatgtga  | 4080 |
|    | aggggtgtac gggtgagacg gatgtgcctg acaccgtccc ggaattcgtc tcgcaacgtc  | 4140 |
|    | gtcgttggtt caacgggtgcc ttcttcgcgg ccgtctactc cctcgtccac ttctgacaaa | 4200 |
|    | tctggaaaac cgaccacacc tttatgcgca aagcccttct ccacgtcgaa ttctcttacc  | 4260 |
| 10 | acctcctgca actcctcttc acctacttct ccctggccaa cttctacctc gccttctact  | 4320 |
|    | ttatcgccgg cggctctgcc gatccccacg tcgacccttt taactcggac ggccacgtcg  | 4380 |
|    | cgcgcatcat cttcaacatc ctccgctacg tctgcgtcct gctgatctgc acacaattca  | 4440 |
|    | tcttgtccct cggcaaccgt ccgcagggtg caaaagaat gtatctcgca tccatgatca   | 4500 |
|    | tctacgccgt catcatggtg tacaccacct tcgccaccat cttcatcgtc gtgcgacaaa  | 4560 |
| 15 | tccaaccctc tcaaaaatcc gacgacaagc ccgacctcga actcggcaac aacgtcttca  | 4620 |
|    | ccaacctgat cgtctccgtg gctagtacct tcgggctcta cttcgtcatg tcctttctct  | 4680 |
|    | atctcgacct ctggcacatg ttcacctcgg ccattccagta ctttgtcctg ctgccttct  | 4740 |
|    | acatctgcac gctccagatc tacgcctttt gcaacaccca cgacgtcaca tggggcacca  | 4800 |
|    | aaggcgacaa cgtgatgcgc accgatctcg gaggcgccat tggcaaggga agcaccgtcg  | 4860 |
| 20 | aactggaaat gccttcggac caactcgaca tcgactcggg atacgacgaa tgtctacgta  | 4920 |
|    | atctccgca tcgcgtcatg gtccctgccg ttcccggtgc cgaggaccag ctgcagcagg   | 4980 |
|    | attactacaa gtcggtgcgc acgtacatgg tgggtgcgtg gatggtggcc aacgcgacgc  | 5040 |
|    | tggccatggc ggtctcggaa gcgtatggcg attcggaaat tggggataat ttttacttgc  | 5100 |
|    | ggtttatcct gtgggcgggtg gcggccctgg cgctgtttag agcgttgggg tcgacgacgt | 5160 |
| 25 | ttgcggcgat taatctggtg agtgctctcg tggagggcag ggtcaggctg aggttgaata  | 5220 |
|    | tgaaaggggt taggtggatt aaggagaagt ggggggatgc ggatgtgaag ggcaagtttg  | 5280 |
|    | aggggttggg ggatcgggag aggggggttg cgaggcgggt agctagcaag cttggacacg  | 5340 |
|    | ctgaaatcac cagtctctct ctacaaatct atctctctct attttctcca taataatgtg  | 5400 |
|    | tgagtagttc ccagataagg gaattaggtt tcctataggg ttctgctcat gtgttgagca  | 5460 |
| 30 | tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta  | 5520 |
|    | attcctaaaa caaaatcca gtactaaaat ccagatcatg catggtacag cggccaattc   | 5580 |
|    | cggggtacgg tcgacggccg agtact                                       | 5606 |

|    |       |                                                                 |
|----|-------|-----------------------------------------------------------------|
|    | <210> | 14                                                              |
|    | <211> | 6464                                                            |
|    | <212> | DNA                                                             |
|    | <213> | Artificial                                                      |
| 5  | <220> |                                                                 |
|    | <223> | T-DNA of pTDBI50                                                |
|    | <220> |                                                                 |
|    | <221> | misc_feature                                                    |
|    | <222> | (1)..(25)                                                       |
| 10 | <223> | LB: Margem esquerda de T-DNA (sintético) (complemento)          |
|    | <220> |                                                                 |
|    | <221> | misc_feature                                                    |
|    | <222> | (56)..(316)                                                     |
|    | <223> | 3'nos: 3' UTR a partir do gene nopalina sintase de T-DNA pTIT37 |
| 15 |       | (complemento)                                                   |
|    | <220> |                                                                 |
|    | <221> | misc_feature                                                    |
|    | <222> | (336)..(887)                                                    |
|    | <223> | bar: CDS de fosfinotrecina acetil transferase de Streptomyces   |
| 20 |       | hygroscopicus (complemento)                                     |
|    | <220> |                                                                 |
|    | <221> | misc_feature                                                    |
|    | <222> | (888)..(1720)                                                   |
|    | <223> | P35S3: região promotora transcrita (complemento)                |
| 25 | <220> |                                                                 |
|    | <221> | misc_feature                                                    |
|    | <222> | (1766)..(3173)                                                  |
|    | <223> | F286: região promotora específica de fibra                      |
|    | <220> |                                                                 |
| 30 | <221> | misc_feature                                                    |
|    | <222> | (3189)..(3250)                                                  |
|    | <223> | 5' cab22L: 5'cab22L: sequência condutora de gene cab22L de Pe-  |

tunia

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3255)..(3359)

5 <223> XylT: Golgi targeting signal of the beta 1,2 xylosyltransferase protein

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3369)..(6203)

10 <223> CHS2: gene quitina sintase 2 de Neurospora crassa

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3369)..(6203)

<223> 3' 35S: fragmento de 3' YTR transcrito CaMV 35S

15 <220>

<221> misc\_feature

<222> (6488)..(6464)

<223> RB: Margem direita de T-DNA (sintético) (complemento)

<400> 14

20 cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgac 60

tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atattttgtt 120

ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaata ataaaaaccc atctcataaa 180

taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 240

gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt 300

25 tgaacgatct gcttcggatc ctagaacgcg tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc 360

ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacgctc atgccagttc 420

ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgctcgtgc 480

atgcgcacgc tcgggtcggt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt 540

gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccgt ccgctggtgg 600

30 cggggggaga cgtacacggt cgactcgccc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag 660

gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720

cgctcccgcga gacggacgag gtcgtccgct cactcctgcg gttcctgcgg ctcggtacgg 780

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | aagttgaccg tgcttgtctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc eggcattgtcc | 840  |
|    | gcctcgggtg caccgcgcat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga  | 900  |
|    | gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac  | 960  |
|    | ttccttatat agaggaaggg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt   | 1020 |
| 5  | cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt gggtggaacg tcttcttttt  | 1080 |
|    | ccacgatgct cctcgtgggt ggggggccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattctt | 1140 |
|    | gaatgatagc ctttcttta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tctttttcta   | 1200 |
|    | ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa  | 1260 |
|    | ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat  | 1320 |
| 10 | ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatgttgac gaagattttc ttcttgtcat  | 1380 |
|    | tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgccagtctt caccgagagt tctgttagat  | 1440 |
|    | cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta  | 1500 |
|    | gagactccaa tctctattac ttgccttggt ttatgaagca agccttgaat cgtccatact  | 1560 |
|    | ggaatagtag ttctgatctt gagaaatatg tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc  | 1620 |
| 15 | ctgaatcttt tgactgcatc tttaaccttc ttgggaaggt atttgatctc ctggagattg  | 1680 |
|    | ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg  | 1740 |
|    | cccgggcata tggcgcgccg gtaccaacc tctcgagctg ccatattggg tttttcacta   | 1800 |
|    | cccacctctt cattaaatgt atcttcaacc tctcaactcc tttcaccacc agacgaatct  | 1860 |
|    | tcttttagcaa aatcaaaatg accttatgaa aatttagcac gtccacctcc agattcaaag | 1920 |
| 20 | gctgtgaatc cccaacttcg gaaattgttc atctccacat tcaagaataa tgagttcctc  | 1980 |
|    | aatttgtttt aactgattag ccgatattaa gcgagttaga ctccatggaa ataaaatcac  | 2040 |
|    | cctaataaat agcaacgctt ttgaacgtct ctaggttcca agcgtgctaa ggagcgccag  | 2100 |
|    | taacttcaat ccaagttgtg cgaaaacgta tgaaatggaa ctgagaccag cgttcaacat  | 2160 |
|    | cgatgaaaat ttgttttaac aatgagaact gcaaatcctc catagtcttc taacatttca  | 2220 |
| 25 | acattcgaaa tctcgaaaag aaattggctt gatatgattt atttaggggtg ttaattttat | 2280 |
|    | gtattataat aatgcacaaa ttgatatttt atgcatcaca tttaatatatt ttaaagtata | 2340 |
|    | taatatacaa tcattttatg aaaataaaaa taccaaataa tacataaatt gatagttcaa  | 2400 |
|    | gtatttcatt aaaaattttc aaaatataaa tatcatattg aaacatttta taaaagaata  | 2460 |
|    | gataccaaat atgacatcat cccctgttga gagtaaccaa aactgtttt catccagccc   | 2520 |
| 30 | atgagaagta tttggcccaa aagcaaaagt ttcagtacaa tgaattatga atcccaaaaa  | 2580 |
|    | aaccccaagt ggtccaggtc caagccagtc tagggctgag gaaagaaatg gaaaaattga  | 2640 |
|    | aaagtaattc cagggcttga ttcaatttta ttaaatttag tttgattttg gtttcggttc  | 2700 |

|    |                                                                      |      |
|----|----------------------------------------------------------------------|------|
|    | ataaatttaa aaataatttt aaaatgttat ataaaactgt tttttaaaaa taaattaatc    | 2760 |
|    | aataatctaa aacgataaaa atggcgattt gaattaagct catattttga aaaaaaata     | 2820 |
|    | aaaattatct catccagaac tgattaaaac cgaaccgatg aatcctagaa gccagccaa     | 2880 |
|    | gtgtgcagag taagaataga acatcaacat tttgctttta gcttttcgtt gcttgcactc    | 2940 |
| 5  | taagaagcat aaaacgcaag caaaacttga cactagtgtg agtgtgagtg cccatcattc    | 3000 |
|    | atcaaccctg aaaatcgccc ttcccctaata cagtttctaac ctcaactttct aacactttca | 3060 |
|    | ctgcagcact caaaaacatt cgccgaatct ttactataaa ctcccagtgt tggtttctcc    | 3120 |
|    | actccaaacc caaaccacga ccaccacatt ttgcttcgta tctttgatata ctagatctcc   | 3180 |
|    | cgggagctca tttctctatt acttcagcca taacaaaaga actcttttct cttcttatta    | 3240 |
| 10 | aaccaaacc atggatgagt aaacggaatc cgaagattct gaagattttt ctgtatatgt     | 3300 |
|    | tactttctcaa ctctctcttt ctcatcatct acttcgtttt tcaactcatcg tcgttttcag  | 3360 |
|    | ccaaaacat ggagtccaga atcagcaacc ggttatcgag ttccgccaca aggacggtac     | 3420 |
|    | gagccttcag aaatcgatgt catgccaggc cagggacacc gggatcgagt tacggaaatg    | 3480 |
|    | cgaggcgacc gcttccctcg gcaccagcgc ctttacacta caatagccca agtcgcgcag    | 3540 |
| 15 | cgagtcatta tccacggtac catggagggt atgcggacga cgtgacagtt agcatgggac    | 3600 |
|    | cggacgacga tcgtacagat atctttggcc ccgaaaccga tctcagcgaa acgcgccacc    | 3660 |
|    | tcaacgacgc atacgggttt cggatcatccc agatcacctt cagcgaagat cccacggca    | 3720 |
|    | cccacgcgcg ttcccggtag gacgacgaag acgatgtgag caccacttat tctccaaca     | 3780 |
|    | cgggcaccag cgcttcaggt gtcgacaagt tcgagcatta cgggtccatt ccggaggaag    | 3840 |
| 20 | gcaagcacga gcggcgcggc gtgcgaccac cacagatgtc gaggaaggaa gtccagctca    | 3900 |
|    | tcaacggcga actcgtttctc gagtgcgaaga ttccgactat attgtattcg tttttgccca  | 3960 |
|    | ggagagacga agtggagttt acgcacatgc ggtacacagc cgtcacttgt gaccctgatg    | 4020 |
|    | actttgttgc caggggttac aagttgcgcc agaatatcgg tcgtaccgcc agggagacgg    | 4080 |
|    | agctgttcat ctgcgtgacc atgtacaacg aggacgagtt cggattcaca cggactatgc    | 4140 |
| 25 | acgcagtcac gaagaacatt tcgcattttt gttcccgaaa caagagtagg acgtggggag    | 4200 |
|    | cggatgggtg gcagaagatt gtggtctgtg tggtttcgga tggacgagag atcattcacc    | 4260 |
|    | cccgacctt ggacgccttc gcagccatgg gcgtttacca gcacgggtat gccagaact      | 4320 |
|    | ttgtcaacca gaaggcgggtg cagggccacg tttacgagta cagacacaa gtgtctctgg    | 4380 |
|    | acagcgacct caagttcaag ggcgccgaga agggcatcgt gccctgccag atgatttttt    | 4440 |
| 30 | gcttgaagga gaagaaccaa aagaaactca actcgcatag atggttcttc aacgcctttg    | 4500 |
|    | gcaaagcctt gaaccgcaat gtgtgtatcc tctagacgt cggcaccgc cccggcggca      | 4560 |
|    | caagtctcta ccatctctgg aaagccttcg acacggattc caacgtggcg ggggcctgcg    | 4620 |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | gggaaatcaa agcgatgaag gggcggtttg gcggaattt gctcaaccct ctggtggcta   | 4680 |
|    | gtcagaactt tgagtacaag atgagcaata ttctggacaa accgttggag tcggtgtttg  | 4740 |
|    | ggtacatcac ggtgttgccg ggcgccttgt cggcgtatcg gtaccatgcg ctgcagaacg  | 4800 |
|    | atgagacggg ccatgggccc ttgagtcagt atttcaaggc cgagacgctc catgggcagc  | 4860 |
| 5  | acgcggatgt gtttacggcg aacatgtact tggccgagga ccgaattctg tgttgggagt  | 4920 |
|    | tggtggccaa gaggggtgag aggtgggtgt tgaagtatgt gaaggggtgt acgggtgaga  | 4980 |
|    | cggatgtgcc tgacaccgct ccggaattcg tctcgcaacg tcgtcgttgg ctcaacggtg  | 5040 |
|    | ccttcttcgc cgccgtctac tccctcgtcc actttcgaca aatctggaaa accgaccaca  | 5100 |
|    | cctttatgcg caaagccctt ctccacgtcg aattcctcta ccacctctg caactcctct   | 5160 |
| 10 | tcacctactt ctccctggcc aacttctacc tcgccttcta ctttatcgcc ggcggtctcg  | 5220 |
|    | ccgatcccca cgtcgacctt tttaactcgg acggccacgt cgcgcgcac atcttcaaca   | 5280 |
|    | tcctccgcta cgtctgcgtc ctgctgatct gcacacaatt catcttgtcc ctcggaacc   | 5340 |
|    | gtccgcaggg tgccaaaaga atgtatctcg catccatgat catctacgcc gtcacatgg   | 5400 |
|    | tgtacaccac cttcgccacc atcttcatcg tcgtgcgaca aatccaacct tctcaaaaat  | 5460 |
| 15 | ccgacgacaa gcccgacctc gaactcggca acaacgtctt caccaacctg atcgtctccg  | 5520 |
|    | tggtctagtac cctcgggctc tacttcgtca tgtcctttct ctatctcgac ccctggcaca | 5580 |
|    | tgttcacctc ggccatccag tactttgtcc tgtgccttc ctacatctgc acgctccaga   | 5640 |
|    | tctacgcctt ttgcaacacc caccacgtca catggggcac caaaggcgac aacgtgatgc  | 5700 |
|    | gcaccgatct cggaggcgcc attggcaagg gaagcaccgt cgaactggaa atgccttcgg  | 5760 |
| 20 | accaactcga catcgactcg ggatacgacg aatgtctacg taatctccgc gatcgcgtca  | 5820 |
|    | tggtccctgc cgttcccgtg tccgaggacc agctgcagca ggattactac aagtcggtgc  | 5880 |
|    | gcacgtacat ggtggtgtcg tggatggtgg ccaacgcgac gctggccatg gcggtctcgg  | 5940 |
|    | aagcgtatgg cgattcggaa attggggata atttttactt gcggtttatc ctgtgggcgg  | 6000 |
|    | tggcggccct ggcgctgttt agagcgttgg ggtcgacgac gtttgcgcg attaatctgg   | 6060 |
| 25 | tgagtgtctt cgtggagggc agggtcaggc tgagggtgaa tatgaaaggg ttaggtgga   | 6120 |
|    | ttaaggagaa gtggggggat gcggatgtga agggcaagtt tgaggggttg ggggatcggg  | 6180 |
|    | cgaggggggtt ggcgaggcgg tgagctagca agcttggaac cgctgaaatc accagtctct | 6240 |
|    | ctctacaaat ctatctctct ctattttctc cataataatg tgtgagtagt tcccagataa  | 6300 |
|    | gggaattagg gttcctatag ggtttcgtc atgtgttgag catataagaa acccttagta   | 6360 |
| 30 | tgtatttgta tttgtaaaat acttctatca ataaaatttc taattcctaa aacaaaaatc  | 6420 |
|    | cagtactaaa atccagatca tgcattgtac agcgcccgcg ttct                   | 6464 |

<211> 982  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Quitina sintase operavelmente ligada ao sinal de marcação XylT  
 golgi  
 <400> 15  
 Met Ser Lys Arg Asn Pro Lys Ile Leu Lys Ile Phe Leu Tyr Met Leu  
 1 5 10 15  
 10 Leu Leu Asn Ser Leu Phe Leu Ile Ile Tyr Phe Val Phe His Ser Ser  
 20 25 30  
 Ser Phe Ser Ala Lys Thr Met Glu Ser Arg Ile Ser Asn Arg Leu Ser  
 35 40 45  
 Ser Ser Ala Thr Arg Thr Val Arg Ala Phe Arg Asn Arg Cys His Ala  
 15 50 55 60  
 Arg Pro Gly Thr Pro Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Ala Arg Arg Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Ala Pro Ala Pro Leu His Tyr Asn Ser Pro Ser Arg Ala Ala  
 85 90 95  
 20 Ser His Tyr Pro Arg Tyr His Gly Gly Tyr Ala Asp Asp Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Met Gly Pro Asp Asp Asp Arg Thr Asp Ile Phe Gly Pro Glu Thr  
 115 120 125  
 Asp Leu Ser Glu Thr Arg His Leu Asn Asp Ala Tyr Gly Phe Arg Ser  
 25 130 135 140  
 Ser Gln Ile Thr Leu Ser Glu Asp Pro His Gly Thr His Ala Arg Ser  
 145 150 155 160  
 Arg Tyr Asp Asp Glu Asp Asp Val Ser Thr Thr Tyr Ser Ser Asn Thr  
 165 170 175  
 30 Gly Thr Ser Ala Ser Gly Val Asp Lys Phe Glu His Tyr Gly Pro Ile  
 180 185 190  
 Pro Glu Glu Gly Lys His Glu Arg Arg Gly Val Arg Pro Pro Gln Met

|    |                                                                 |     |         |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
|    | 195                                                             | 200 | 205     |
|    | Ser Arg Lys Glu Val Gln Leu Ile Asn Gly Glu Leu Val Leu Glu Cys |     |         |
|    | 210                                                             | 215 | 220     |
|    | Lys Ile Pro Thr Ile Leu Tyr Ser Phe Leu Pro Arg Arg Asp Glu Val |     |         |
| 5  | 225                                                             | 230 | 235 240 |
|    | Glu Phe Thr His Met Arg Tyr Thr Ala Val Thr Cys Asp Pro Asp Asp |     |         |
|    | 245                                                             | 250 | 255     |
|    | Phe Val Ala Arg Gly Tyr Lys Leu Arg Gln Asn Ile Gly Arg Thr Ala |     |         |
|    | 260                                                             | 265 | 270     |
| 10 | Arg Glu Thr Glu Leu Phe Ile Cys Val Thr Met Tyr Asn Glu Asp Glu |     |         |
|    | 275                                                             | 280 | 285     |
|    | Phe Gly Phe Thr Arg Thr Met His Ala Val Met Lys Asn Ile Ser His |     |         |
|    | 290                                                             | 295 | 300     |
|    | Phe Cys Ser Arg Asn Lys Ser Arg Thr Trp Gly Ala Asp Gly Trp Gln |     |         |
| 15 | 305                                                             | 310 | 315 320 |
|    | Lys Ile Val Val Cys Val Val Ser Asp Gly Arg Glu Ile Ile His Pro |     |         |
|    | 325                                                             | 330 | 335     |
|    | Arg Thr Leu Asp Ala Leu Ala Ala Met Gly Val Tyr Gln His Gly Ile |     |         |
|    | 340                                                             | 345 | 350     |
| 20 | Ala Lys Asn Phe Val Asn Gln Lys Ala Val Gln Ala His Val Tyr Glu |     |         |
|    | 355                                                             | 360 | 365     |
|    | Tyr Thr Thr Gln Val Ser Leu Asp Ser Asp Leu Lys Phe Lys Gly Ala |     |         |
|    | 370                                                             | 375 | 380     |
|    | Glu Lys Gly Ile Val Pro Cys Gln Met Ile Phe Cys Leu Lys Glu Lys |     |         |
| 25 | 385                                                             | 390 | 395 400 |
|    | Asn Gln Lys Lys Leu Asn Ser His Arg Trp Phe Phe Asn Ala Phe Gly |     |         |
|    | 405                                                             | 410 | 415     |
|    | Lys Ala Leu Asn Pro Asn Val Cys Ile Leu Leu Asp Val Gly Thr Arg |     |         |
|    | 420                                                             | 425 | 430     |
| 30 | Pro Gly Gly Thr Ser Leu Tyr His Leu Trp Lys Ala Phe Asp Thr Asp |     |         |
|    | 435                                                             | 440 | 445     |
|    | Ser Asn Val Ala Gly Ala Cys Gly Glu Ile Lys Ala Met Lys Gly Arg |     |         |

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 450                                                             | 455 | 460 |     |
|    | Phe Gly Gly Asn Leu Leu Asn Pro Leu Val Ala Ser Gln Asn Phe Glu |     |     |     |
|    | 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
|    | Tyr Lys Met Ser Asn Ile Leu Asp Lys Pro Leu Glu Ser Val Phe Gly |     |     |     |
| 5  |                                                                 | 485 | 490 | 495 |
|    | Tyr Ile Thr Val Leu Pro Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr His Ala |     |     |     |
|    |                                                                 | 500 | 505 | 510 |
|    | Leu Gln Asn Asp Glu Thr Gly His Gly Pro Leu Ser Gln Tyr Phe Lys |     |     |     |
|    |                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| 10 | Gly Glu Thr Leu His Gly Gln His Ala Asp Val Phe Thr Ala Asn Met |     |     |     |
|    |                                                                 | 530 | 535 | 540 |
|    | Tyr Leu Ala Glu Asp Arg Ile Leu Cys Trp Glu Leu Val Ala Lys Arg |     |     |     |
|    |                                                                 | 545 | 550 | 555 |
|    | Gly Glu Arg Trp Val Leu Lys Tyr Val Lys Gly Cys Thr Gly Glu Thr |     |     |     |
| 15 |                                                                 | 565 | 570 | 575 |
|    | Asp Val Pro Asp Thr Val Pro Glu Phe Val Ser Gln Arg Arg Arg Trp |     |     |     |
|    |                                                                 | 580 | 585 | 590 |
|    | Leu Asn Gly Ala Phe Phe Ala Ala Val Tyr Ser Leu Val His Phe Arg |     |     |     |
|    |                                                                 | 595 | 600 | 605 |
| 20 | Gln Ile Trp Lys Thr Asp His Thr Phe Met Arg Lys Ala Leu Leu His |     |     |     |
|    |                                                                 | 610 | 615 | 620 |
|    | Val Glu Phe Leu Tyr His Leu Leu Gln Leu Leu Phe Thr Tyr Phe Ser |     |     |     |
|    |                                                                 | 625 | 630 | 635 |
|    | Leu Ala Asn Phe Tyr Leu Ala Phe Tyr Phe Ile Ala Gly Gly Leu Ala |     |     |     |
| 25 |                                                                 | 645 | 650 | 655 |
|    | Asp Pro His Val Asp Pro Phe Asn Ser Asp Gly His Val Ala Arg Ile |     |     |     |
|    |                                                                 | 660 | 665 | 670 |
|    | Ile Phe Asn Ile Leu Arg Tyr Val Cys Val Leu Leu Ile Cys Thr Gln |     |     |     |
|    |                                                                 | 675 | 680 | 685 |
| 30 | Phe Ile Leu Ser Leu Gly Asn Arg Pro Gln Gly Ala Lys Arg Met Tyr |     |     |     |
|    |                                                                 | 690 | 695 | 700 |
|    | Leu Ala Ser Met Ile Ile Tyr Ala Val Ile Met Val Tyr Thr Thr Phe |     |     |     |

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
|    | Ala Thr Ile Phe Ile Val Val Arg Gln Ile Gln Pro Ser Gln Lys Ser |     |     |     |
|    | 725                                                             | 730 | 735 |     |
|    | Asp Asp Lys Pro Asp Leu Glu Leu Gly Asn Asn Val Phe Thr Asn Leu |     |     |     |
| 5  | 740                                                             | 745 | 750 |     |
|    | Ile Val Ser Val Ala Ser Thr Leu Gly Leu Tyr Phe Val Met Ser Phe |     |     |     |
|    | 755                                                             | 760 | 765 |     |
|    | Leu Tyr Leu Asp Pro Trp His Met Phe Thr Ser Ala Ile Gln Tyr Phe |     |     |     |
|    | 770                                                             | 775 | 780 |     |
| 10 | Val Leu Leu Pro Ser Tyr Ile Cys Thr Leu Gln Ile Tyr Ala Phe Cys |     |     |     |
|    | 785                                                             | 790 | 795 | 800 |
|    | Asn Thr His Asp Val Thr Trp Gly Thr Lys Gly Asp Asn Val Met Arg |     |     |     |
|    | 805                                                             | 810 | 815 |     |
|    | Thr Asp Leu Gly Gly Ala Ile Gly Lys Gly Ser Thr Val Glu Leu Glu |     |     |     |
| 15 | 820                                                             | 825 | 830 |     |
|    | Met Pro Ser Asp Gln Leu Asp Ile Asp Ser Gly Tyr Asp Glu Cys Leu |     |     |     |
|    | 835                                                             | 840 | 845 |     |
|    | Arg Asn Leu Arg Asp Arg Val Met Val Pro Ala Val Pro Val Ser Glu |     |     |     |
|    | 850                                                             | 855 | 860 |     |
| 20 | Asp Gln Leu Gln Gln Asp Tyr Tyr Lys Ser Val Arg Thr Tyr Met Val |     |     |     |
|    | 865                                                             | 870 | 875 | 880 |
|    | Val Ser Trp Met Val Ala Asn Ala Thr Leu Ala Met Ala Val Ser Glu |     |     |     |
|    | 885                                                             | 890 | 895 |     |
|    | Ala Tyr Gly Asp Ser Glu Ile Gly Asp Asn Phe Tyr Leu Arg Phe Ile |     |     |     |
| 25 | 900                                                             | 905 | 910 |     |
|    | Leu Trp Ala Val Ala Ala Leu Ala Leu Phe Arg Ala Leu Gly Ser Thr |     |     |     |
|    | 915                                                             | 920 | 925 |     |
|    | Thr Phe Ala Ala Ile Asn Leu Val Ser Ala Leu Val Glu Gly Arg Val |     |     |     |
|    | 930                                                             | 935 | 940 |     |
| 30 | Arg Leu Arg Leu Asn Met Lys Gly Phe Arg Trp Ile Lys Glu Lys Trp |     |     |     |
|    | 945                                                             | 950 | 955 | 960 |
|    | Gly Asp Ala Asp Val Lys Gly Lys Phe Glu Gly Leu Gly Asp Arg Ala |     |     |     |

965

970

975

Arg Gly Leu Ala Arg Arg

980

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados na parede celular, particularmente, a parede de célula secundária de uma célula de planta, sendo que o dito método compreende
- 5 i. introduzir ou proporcionar um gene quimérico na célula de planta, sendo que o dito gene quimérico compreende:
1. um promotor exprimível por planta;
  2. uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, em que a dita N-acetilglicosamina transferase pode ser marcada nas membranas do aparelho de Golgi; e
  3. uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a dita N-acetilglicosamina transferase compreende uma seqüência âncora sinal selecionada da seqüência âncora sinal de uma sialil transferase de rato, a seqüência âncora sinal de uma galactosil transferase humana, a seqüência âncora sinal do homólogo de Arabidopsis do receptor HDEL de levedura (AtERD2), a seqüência âncora sinal da  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase, a seqüência âncora sinal de  $\beta$ -1,2-xilosiltransferase de *Arabidopsis thaliana*, a seqüência
- 15 âncora sinal de N-acetilglucosaminil transferase I de tabaco ou a seqüência de aminoácido YYHDL ou LKLEI.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a dita N-acetilglicosamina transferase compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID Nº 15 da posição 1 à posição 35.
- 25 4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a dita N-acetilglicosamina transferase compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID Nº 15.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito método compreende
- 30 i. introduzir ou proporcionar um gene quimérico na célula de planta, sendo que o dito gene quimérico compreende:
1. um promotor exprimível por planta;

2. uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC; e

3. uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que os ditos oligossacarídeos positivamente carregados consistem em  $\beta$ - N-acetilglicosaminas 1-4 ligadas que compreendem 1 a 10 monômeros.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, que compreende adicionalmente a etapa de tratar a dita parede celular com uma solução alcali, durante um tempo suficiente para desacetilar o dito oligossacarídeo que consiste em monômeros de N-acetilglicosamina.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, em que a dita região de DNA codifica uma N-acetilglicosamina transferase tipo NODC obtível de uma espécie *Rhizobium*, uma espécie *Azorhizobium*, uma espécie *Bradyrhizobium*, uma espécie *Mesorhizobium*, uma espécie *Ralstonia*, uma espécie *Streptomyces*, uma espécie *Burkholderia*, uma espécie *Cupriavidus* ou uma espécie *Sinorhizobium*.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, em que o dito NODC compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 6, SEQ ID Nº 7, SEQ ID Nº 8, SEQ ID Nº 9, CAA67139, CAA608779, CAA51774, CAA51773, CAA25811, CAA25810, CAA25814, CAA68619, CAA2350, CAD31533, CAC05896, CAH04369, CAB56055, NP\_629203, P26024, P17862, BAB524500, AAX30050, AAX30049, E38180, JQ0396, ZZZRC4, ZZZRCL, A95321, C23766, C26813, NP\_659761, NP\_443883, NP\_106714, NP\_768667, NP\_435719, BAC47292, AAU11365, AAU11364, AAU11363, AAU11362, AAU11361, AAU11360, AAU11359, AAU11358, AAU11357, AAU11356, AAU11355, AAU11354, AAU11353, AAU11352, AAU11351, AAU11350, AAU114349, AAU11348, AAU11347, AAU11346, AAU11345, AAU11344, AAU11343, AAU11342, AAU11341, AAU11340, AAU11339, AAU11338, AAK65131, AAS91748, P04679\_2, P04679\_1, P04679, P72334, Q53513, P50357, P04678, P50536, P53417, Q07755, P04341, P04340, P24151, P04677, CAD90588, CAD90587, CAD90586,

CAD90585, CAD90584, CAD90583, CAD90257, CAD43933, AAM54775, AAN62903, S34305, S09522, S07304, AAL88670, CAD29957, CAD29956, CAD29955, CAD29954, CAD29953, CAD 29952, CAD29951, CAD29950, CAD29949, CAC42489, AAK53549, AAK53548, AAK50872, AAK39967, A-  
 5 AK39966, AAK39965, AAK39964, AAK39963, AAK39962, AAK39961, A-  
 AK39960, AAK39959, AAK39958, AAK39957, AAK39956, AAG44125, A-  
 AK00157, AAG60998, AAB71694, AAB16897, AAV80567, AAB95329, BA-  
 A24092, BAA06089, BAA06086, BAA06085, BAA06083, BAA06090, BA-  
 A06082, BAA06087, BAA06088, BAA06084, AAB91695, AAB51164, A-  
 10 AB47353, AAB34509, AAB24745, 1615305E, 1615305D, 165305C, CA-  
 A26311, CAA26310, CAA3731, AAA63602 ou 26226.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que o dito exprimível por planta é um promotor selecionado do promotor específico de fibra de um gene beta tubulina de algodão, um promotor  
 15 específico de fibra de um gene actina de algodão, um promotor específico de fibra de um gene de proteína de transferência de lipídeo de algodão, um promotor de um gene expansina de algodão ou um promotor de um gene quitinase em algodão.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a dita planta é selecionada de algodão, cânhamo ou linho.  
 20

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a dita planta é algodão e de preferência, a dita parede celular de planta está compreendida dentro de uma fibra.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, que compreende adicionalmente a etapa de isolar a dita parede celular de planta ou dita fibra.  
 25

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que a dita parede celular de planta é uma parede de célula secundária.

15. Parede celular de planta que compreende uma quantidade aumentada de polissacarídeos ou oligossacarídeos, particularmente oligossacarídeos positivamente carregados, tais como oligo-N acetilglicosaminas  
 30

ou oligoglicosaminas, de preferência, oligômeros de N-acetilglicosamina ou glicosamina com um grau de polimerização entre 3 e 10, particularmente entre 3 e 5.

5 16. Parede celular de planta obtenível através dos métodos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

17. Parede celular de planta de acordo com a reivindicação 15, que é obtenível a partir de uma célula radicular ou uma célula de fibra.

18. Célula de planta secundária que é capaz de ligar especificamente aglutinina de germe de trigo.

10 19. Fibra de algodão obtenível através do método como definido na reivindicação 13.

20. Fibra de algodão que é capaz de ligar especificamente aglutinina de germe de trigo.

15 21. Fibra de algodão de acordo com a reivindicação 20, em que a dita WGA ligada é uniformemente distribuída por toda a parede de célula secundária de dita fibra.

22. Fio ou tecido feito a partir das paredes celulares de planta, como definidas em qualquer uma das reivindicações 15 a 18 ou uma fibra de algodão como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 21.

20 23. Célula de planta que compreende um gene quimérico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

24. Planta que consiste essencialmente nas células de planta como definidas na reivindicação 23.

25. Planta, de acordo com a reivindicação 24, que é algodão.

25 26. Uso da parede celular de planta como definida em qualquer uma das reivindicações 15 a 18, da fibra de algodão como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 21, ou do fio ou tecido como definido na reivindicação 22

a. para a liberação controlada de um composto medicinal;

30 b. para a produção de um dispositivo flocculento em purificação de efluente;

c. como um estabilizador em indústria alimentícia, particularmen-

te para aumentar a estabilidade ao congelamento-descongelamento;

- d. como um fluido de congelamento em perfuração;
- e. para a produção de panos funcionais com ação higiênica;
- f. para a produção de tecido para cicatrização de feridas; ou
- g. para a produção de papel.

5

27. Uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase capaz de ser marcada no aparelho de Golgi de uma célula de planta para aumentar a quantidade de oligossacarídeos positivamente carregados na parede celular de uma célula de planta ou para

10 aumentar a reatividade de paredes celulares de planta para modificações químicas de tais paredes celulares de planta.

28. Uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC para aumentar a quantidade de oligossacarídeos positivamente carregados na parede de célula de uma

15 célula de planta.

29. Uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC para aumentar a reatividade de paredes celulares de planta para modificações químicas de tais paredes celulares de planta.

20 30. Uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC para obter paredes celulares de planta com liberação controlada aperfeiçoada de substâncias, tais como fármacos.

31. Gene quimérico que compreende as seguintes regiões de

25 DNA ligadas de forma operável:

- a. um promotor exprimível por planta;
- b. uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, a dita N-acetilglicosamina transferase quando expressa em uma célula de planta, pode ser marcada no aparelho de Golgi de dita célula de
- 30 planta; e
- c. uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.

32. Gene quimérico de acordo com a reivindicação 31, em que a

dita N-acetilglicosamina transferase é ligada a uma seqüência de sinal heteróloga que marca a dita N-acetilglicosamina transferase no aparelho de Golgi da dita célula de planta.

33. Gene quimérico de acordo com a reivindicação 32, em que a dita N-acetilglicosamina transferase compreende uma seqüência âncora de sinal selecionada a partir da seqüência âncora de sinal de uma sialil transferase de rato, a seqüência âncora sinal de uma galactosil transferase humana, a seqüência âncora sinal do homólogo de Arabidopsis do receptor HDEL de levedura (AtERD2), a seqüência âncora sinal da  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase, a seqüência âncora sinal de  $\beta$ -1,2-xilosiltransferase de *Arabidopsis thaliana*, a seqüência âncora sinal de N-acetilglucosaminil transferase I de tabaco ou a seqüência de aminoácido YYHDL ou LKLEI.

34. Gene quimérico de acordo com a reivindicação 32, em que a dita N-acetilglicosamina transferase compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID Nº 15 da posição 1 à posição 35.

35. Gene quimérico, de acordo com a reivindicação 32, em que a dita N-acetilglicosamina transferase compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID No. 15.

36. Gene quimérico, de acordo com a reivindicação 31, em que a dita N-acetilglicosamina transferase é uma N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC.

37. Gene quimérico de acordo com a reivindicação 36, onde a dita N-acetilglicosamina transferase tipo NODC é obtenível de uma espécie *Rhizobium*, uma espécie *Azorhizobium*, uma espécie *Bradyrhizobium*, uma espécie *Mesorhizobium*, uma espécie *Ralstonia*, uma espécie *Streptomyces*, uma espécie *Burkholderia* ou uma espécie *Sinorhizobium*.

38. Gene quimérico de acordo com a reivindicação 36, em que a dita N-acetilglicosamina transferase do tipo NODC compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, CAA67139, CAA608779, CAA51774, CAA51773, CAA25811, CAA25810, CAA25814, CAA68619, CAA2350, CAD31533, CAC05896, CAH04369,

CAB56055, NP\_629203, P26024, P17862, BAB524500, AAX30050, A-  
 AX30049, E38180, JQ0396, ZZZRC4, ZZZRCL, A95321, C23766, C26813,  
 NP\_659761, NP\_443883, NP\_106714, NP\_768667, NP\_435719,  
 BAC47292, AAU11365, AAU11364, AAU11363, AAU11362, AAU11361,  
 5 AAU11360, AAU11359, AAU11358, AAU11357, AAU11356, AAU11355,  
 AAU11354, AAU11353, AAU11352, AAU11351, AAU11350, AAU114349,  
 AAU11348, AAU11347, AAU11346, AAU11345, AAU11344, AAU11343,  
 AAU11342, AAU11341, AAU11340, AAU11339, AAU11338, AAK65131,  
 AAS91748, P04679\_2, P04679\_1, P04679, P72334, Q53513, P50357,  
 10 P04678, P50536, P53417, Q07755, P04341, P04340, P24151, P04677,  
 CAD90588, CAD90587, CAD90586, CAD90585, CAD90584, CAD90583,  
 CAD90257, CAD43933, AAM54775, AAN62903, S34305, S09522, S07304,  
 AAL88670, CAD29957, CAD29956, CAD29955, CAD29954, CAD29953,  
 CAD 29952, CAD29951, CAD29950, CAD29949, CAC42489, AAK53549,  
 15 AAK53548, AAK50872, AAK39967, AAK39966, AAK39965, AAK39964, A-  
 AK39963, AAK39962, AAK39961, AAK39960, AAK39959, AAK39958, A-  
 AK39957, AAK39956, AAG44125, AAK00157, AAG60998, AAB71694, A-  
 AB16897, AAV80567, AAB95329, BAA24092, BAA06089, BAA06086, BA-  
 A06085, BAA06083, BAA06090, BAA06082, BAA06087, BAA06088, BA-  
 20 A06084, AAB91695, AAB51164, AAB47353, AAB34509, AAB24745,  
 1615305E, 1615305D, 165305C, CAA26311, CA-  
 A26310, CAA3731, AAA63602 ou 26226.

39. Gene quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindi-  
 cações 31 a 38, em que o dito promotor é um promotor seletivo de fibra, par-  
 25 ticularmente, o promotor seletivo de fibra selecionado do promotor específico  
 de fibra de um gene beta tubulina de algodão, um promotor específico de  
 fibra de um gene actina de algodão, um promotor específico de fibra de um  
 gene de proteína de transferência de lipídeo de algodão, um promotor de um  
 gene expansina de algodão ou um promotor de um gene quitinase em algo-  
 30 dão.

40. Uso de uma parede celular de planta, como definida em  
 qualquer uma das reivindicações 16 a 18, ou uma fibra, como definida em

qualquer uma das reivindicações 19 a 21, para modificação química adicional da dita parede celular de planta ou dita fibra.

41. Método para aumentar a quantidade de oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados, particularmente a parede de célula secundária de uma célula de planta, sendo que o dito método compreende

i. introduzir um gene quimérico na célula de planta, sendo que o dito gene quimérico compreende os seguintes fragmentos de DNA ligados de forma operável:

1. um promotor exprimível por planta;
2. uma região de DNA que codifica quitina sintase; e
3. uma terminação de transcrição e região de poliadenilação.

ii. aplicar na dita célula de planta uma quantidade eficaz de N-acetilglicosamina, glicosamina-6-fosfato, N-acetilglicosamina-6-fosfato, N-acetilglicosamina-1-fosfato ou UDP-N-acetilglicosamina.

42. Uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase para aumentar a reatividade de paredes celulares de planta para modificações químicas de tais paredes celulares de planta.

43. Uso de uma região de DNA que codifica uma N-acetilglicosamina transferase para aumentar a reatividade de fibras de algodão para modificações químicas de tais fibras de algodão.

|                |                   |                   |                   |                   |                    |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| ROT_NODC_RHILP | MTMLDTTSTV        | AVSLYALLST        | AYKS              | LPTDVSILASH       | GLGFDLPS           |
| ROT_NODC_BRAJA | MDLLATTSA         | AVSSYALLST        | IYKSVQALYA        | QPAINSSLDN        | LGQAEVVVPA         |
| ROT_NODC_RHIS3 | MDLLTTTSTV        | AVACYALLST        | VYKGMQAVYS        | LPPTVAPASE        | DLVGSDLWPS         |
| ROT_NODC_RHISN | MDLLGTTGAV        | AISLYAALST        | AYKGMQAIYA        | LPTNTTAAST        | PVTGSGAPPS         |
| ROT_NODC_RHILV | MTLLATTSSIA       | AISLYAMLST        | VYKSAQVFHA        | RRTTISTTPA        | KDIETNPVPS         |
| ROT_NODC_AZOCA | MSVVDVIGLL        | ATAAVVTLAS        | AYKVQFIN.         | VSSVTDVAGL        | ESDALPLTPR         |
|                | <b>M-----</b>     | <b>A---Y--L--</b> | <b>-YK--Q----</b> | <b>-----</b>      | <b>-----P-</b>     |
|                |                   |                   |                   |                   |                    |
| ROT_NODC_RHILP | VDVIVPSFNE        | DPRTLSECLA        | SIAGQEYGGR        | LQVYLVDDGS        | ENREALRLVH         |
| ROT_NODC_BRAJA | VDVIVPCFNE        | NPNTLAECLE        | SIASQDYAGK        | MQVYVDDGS         | ANRDVVAFVH         |
| ROT_NODC_RHIS3 | VDVVIIPCYNE       | GPTLSACLD         | SIANQEYAGK        | LRVYVDDGS         | GNRDAVPIH          |
| ROT_NODC_RHISN | VDVIVPCYNE        | DPRALSACLA        | SIAKQDYAGE        | LRVYVDDGS         | GNRNAIIPVH         |
| ROT_NODC_RHILV | VDVIVPCFNE        | DPIVLSECLA        | SLAEQDYAGK        | LRIYVDDGS         | KNRDAVVAQR         |
| ROT_NODC_AZOCA | VDVIVPTFNE        | NSSTLLECVA        | SICAQDYRGP        | ITIVVDDGS         | TNKTSFHAVC         |
|                | <b>VDVI-P--NE</b> | <b>----L-C---</b> | <b>S---Q-Y-G-</b> | <b>-----VDDGS</b> | <b>-N-----</b>     |
|                |                   |                   |                   |                   |                    |
| ROT_NODC_RHILP | EAFADPRFN         | ILLPQNVGK         | RKAQDRCDQR        | SAGDMVLNVD        | SDTILASDVI         |
| ROT_NODC_BRAJA | RIYASDPRFS        | FILLANNVGK        | RKAQIAAIRS        | SSGDLVLNVD        | SDTILAADVV         |
| ROT_NODC_RHIS3 | DNVAGDPREF        | FILLPENVGK        | RKAQIAAIRR        | SSGDLVLNVD        | SDTTLASDVI         |
| ROT_NODC_RHISN | DHYACDPREF        | FILMPKNVGK        | RKAQIVAIRE        | SSGDLVLNVD        | SDTTIAPDVI         |
| ROT_NODC_RHILV | AAYADDERFN        | FTILPKNVGK        | RKA. IAAITQ       | SSGDLILNVD        | SDTTIAPDVI         |
| ROT_NODC_AZOCA | DKYASDERFI        | FVELDQNKGT        | A. AQMEAIRR       | TDGDLILNVD        | SDTVIDKDVV         |
|                | <b>---A-D-R--</b> | <b>F-----N-G-</b> | <b>--A-----</b>   | <b>--GD--LNVD</b> | <b>SDT-----DV-</b> |
|                |                   |                   |                   |                   |                    |
| ROT_NODC_RHILP | RKLVPKNARV        | AVGR. MGOLT       | GPQPKROLAD        | PFDDMEYWLA        | CNEERSQQAR         |
| ROT_NODC_BRAJA | TKLVLKMHDP        | GIGAAMGOLI        | ASNRNQTWLT        | RLIDMEYWLA        | CNEERAAQAR         |
| ROT_NODC_RHIS3 | RKLARKMQDP        | AIGAAMGOLT        | ASNRSDTWLT        | RLIDMEYWLA        | CNEERAAQAR         |
| ROT_NODC_RHISN | TKLALKMYSP        | AVGAAMGOLT        | ASNRSDTWLT        | RLIDMEYWLA        | CNEERAAQAR         |
| ROT_NODC_RHILV | SKLAHKMRDP        | AVGAAMGOMK        | ASNQADTWLT        | RLIDMEYWLA        | CNEERAAQAR         |
| ROT_NODC_AZOCA | TKLASSMRAP        | NVGGVMGQLV        | AKNRERSWLT        | RLIDMEYWLA        | CNEERTAQSR         |
|                | <b>-KL-----</b>   | <b>--G--MGQ--</b> | <b>-----</b>      | <b>---DMEYWLA</b> | <b>CNEER--Q-R</b>  |
|                |                   |                   |                   |                   |                    |
| ROT_NODC_RHILP | FGVVMFCSGS        | CVMYRLVSA.        | SLLDQYDAQY        | FRKQR.. FGE       | . IDIHLSHAE        |
| ROT_NODC_BRAJA | FGAVMCCCGP        | CAMYYRRSALA       | LLLDQYEAQF        | FRGKPSDFGE        | DRHLTILMLK         |
| ROT_NODC_RHIS3 | FGAVMCCCGP        | CAMYYRRSIL        | SLLDQYETQM        | FRGKPSDFGE        | DRHLTILMLE         |
| ROT_NODC_RHISN | FGAVMCCCGP        | CAMYYRSAIL        | LLLDKYETQL        | FRGRPSDFGE        | DRHLTILMLN         |
| ROT_NODC_RHILV | FGAVMCCCGP        | CAMYYRSAML        | SLLDQYETQL        | YRGKPSDFGE        | DRHLTILMLS         |
| ROT_NODC_AZOCA | FGVVMCCCGP        | CAMYYRSALT        | PLLAIEYHQT        | FLGRPSNFE         | DRHLTILMLK         |
|                | <b>FG-VM-C-G-</b> | <b>C-MYR-----</b> | <b>-LL-Y---Q-</b> | <b>F-----FGE</b>  | <b>-----</b>       |

FIG. 1

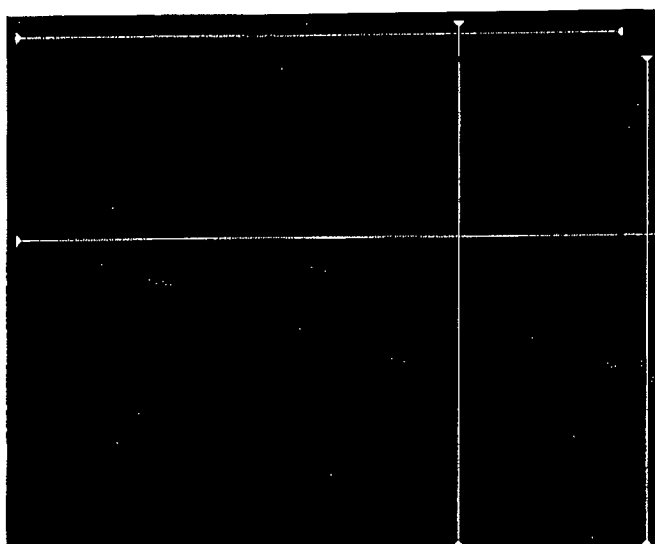
|                |            |            |             |            |             |
|----------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| ROT_NODC_RHILP | GSFTEYRPS  | AHAATVVPNK | LGPVIGQQLR  | WARSTERTTL | LGAP.LPNLN  |
| ROT_NODC_BRAJA | AGERTEYVPD | AIAATVVPHS | LRPYLRQQLR  | WARSTFRDTF | LAWRLLPELD  |
| ROT_NODC_RHIS3 | AGERTEYVPD | AIAATVVPR  | LGPYLRQQLR  | WARSTFRDTL | LALRLLPGLD  |
| ROT_NODC_RHISN | AGERTEYVPE | AIAATVVPNS | MGAYLRQQLR  | WARSTFRDTL | LALRLLPGLD  |
| ROT_NODC_RHILV | AGERTEYVPS | AIAATVVPDT | MGVYLRQQLR  | WARSTFRDTL | LALVLPGLD   |
| ROT_NODC_AZOCA | AGERTGYVPS | AVARTLVPDG | .SPYLRQQLR  | WARSTYRDTA | LALRIKKNLS  |
|                | --FRT-Y-P- | A-A-T-VP-- | ---YL-QQLR  | WARST-R-T- | L-----      |
|                |            |            |             |            |             |
| ROT_NODC_RHILP | RFLMLDVVGQ | NLGPLLDDHS | VLTLGLAQLAL | TGTAPWLAAL | MIVAMTIDRC  |
| ROT_NODC_BRAJA | GYLTLDVIGQ | NLGPLLALIS | SLAALAQLLI  | DGSIPWWTGL | TIAAMTVVRC  |
| ROT_NODC_RHIS3 | RYLTLDVVGQ | NLGPLLALIS | VIAGIAQFAL  | TATLPWPTIL | VIAAMTIIRC  |
| ROT_NODC_RHISN | RYLTLDVIGQ | NLGPLLALIS | VLTLGLAQLAL | TATVPWSTIL | MIASMTMVRC  |
| ROT_NODC_RHILV | RYLTLDVIGQ | NLGPLLALIS | VLTLGLAQLAL | TATLPWWTIL | VIGSMTLVRC  |
| ROT_NODC_AZOCA | KYITFEICAQ | NLGTALLVM  | TMISLSLTTS  | GSQTPVILG  | VVVGMSIIRC  |
|                | -----Q     | N-G--LL--  | -----P      | -----M     | -----RC     |
|                |            |            |             |            |             |
| ROT_NODC_RHILP | SVVALRARQL | RFLGFSLHTE | INIFLLPLK   | AYALCTLSNI | AWLSSLLCWQ  |
| ROT_NODC_BRAJA | CVAALRAREL | RFIGFSLHTP | INICLLPLK   | AYALCTLSNS | DWLSRKVTDM  |
| ROT_NODC_RHIS3 | TVTACRARQA | RFIGFSLHTF | INIFLLPLK   | AYALCTLSNS | DWLSRKATATL |
| ROT_NODC_RHISN | GVAAFRAREL | RFLGFSLHTL | LNVALLLPLK  | AYALCTLSNS | DWLSRGSPAA  |
| ROT_NODC_RHILV | SVAAYRAREL | RFLGFALHTL | VNIFLLIPLK  | AYALCTLSNS | DWLSRGSAI   |
| ROT_NODC_AZOCA | CSVALIAKDF | RFLYFIVHSA | LNVLILTPLK  | LYALLTIRDS | RWLSRESS..  |
|                | -----RF-F  | ---H--     | -N---L-PLK  | -YAL-T---- | -WLS-----   |
|                |            |            |             |            |             |
| ROT_NODC_RHILP | LESTSTADAR | TT.....    | ....ECSDMR  | TASKLSPPPS | CQANDV....  |
| ROT_NODC_BRAJA | PTEEGKQPIV | LHPNAGRSPA | GVGGRLLLFV  | RRYRSLHRA  | WRRRRVFPVA  |
| ROT_NODC_RHIS3 | PNADKKQIIV | ANPIAGVGTG | SSGSAEAIIR  | TDLPRDSSKL | VNADSVCSAE  |
| ROT_NODC_RHISN | APNGVKDSPE | PHC.....   | .....       | .....      | .....       |
| ROT_NODC_RHILV | APTVGQGGAT | KMP.....   | .....GR     | ATSEIAYSGE |             |
| ROT_NODC_AZOCA | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       |
|                |            |            |             |            |             |
| ROT_NODC_RHILP | IVRLSTNKWS | ADDSGRKPSV | IRARVGCRRP  | VAPRH      |             |
| ROT_NODC_BRAJA | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       |
| ROT_NODC_RHIS3 | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       |
| ROT_NODC_RHISN | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       |
| ROT_NODC_RHILV | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       |
| ROT_NODC_AZOCA | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       |

FIG. 1 continuação

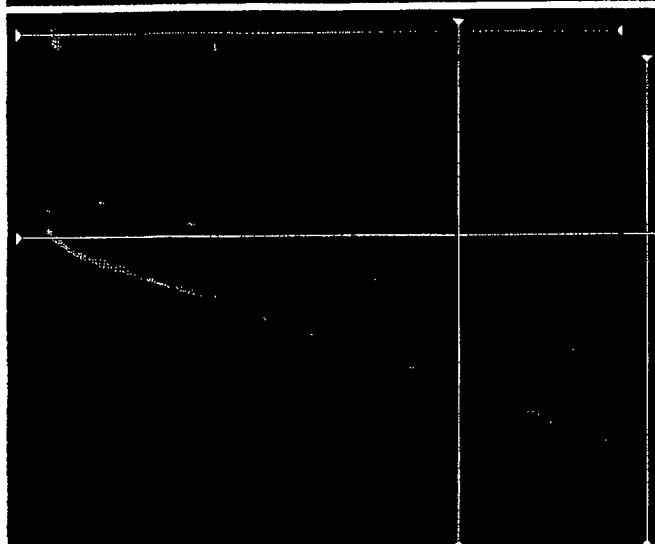
|                |             |              |             |            |             |
|----------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|
| ROT_NODC_BRAJA | MDLLATTSAA  | AVSSYALLST   | IYKSVQALYA  | QPAINSSLDN | LGQAEVVVPA  |
| ROT_NODC_RHIS3 | MDLLTTTSTV  | AVACYALLST   | VYKGMQAVYS  | LPPTVAPASE | DLVGSDLWPS  |
| ROT_NODC_RHISN | MDLLGTTGAV  | AIISLYAALST  | AYKGMQAIYA  | LPTNTTAAST | PVTGSGAPPS  |
| ROT_NODC_RHILV | MTLLATTSIA  | AIISLYAMLST  | VYKSAQVFHA  | RRTTISTTPA | KDIETNPVPS  |
| ROT_NODC_AZOCA | MSVVDVIGLL  | ATAAYVTLAS   | AYKVVOFIN.  | VSSVTDVAGL | ESDALPLTPR  |
|                | M-----      | A---Y--L--   | -YK--Q----- | -----      | -----P-     |
|                |             |              |             |            |             |
| ROT_NODC_BRAJA | VDVIVPCFNE  | NPNTLAECL    | SIASQDYAGK  | MQVYVDDGS  | ANRDVAVPVH  |
| ROT_NODC_RHIS3 | VDVIIIPCYNE | GPLTSLACLD   | SIANQEYAGK  | LRVYVDDGS  | GNRDAVPIPH  |
| ROT_NODC_RHISN | VDVIVPCYNE  | DPRLSACLA    | SIKQDYAGE   | LRVYVDDGS  | GNRNAIIPVH  |
| ROT_NODC_RHILV | VDVIVPCFNE  | DPIVLSECLA   | SLAEQDYAGK  | LRIYVDDGS  | KNRDAVVAQR  |
| ROT_NODC_AZOCA | VDVIVPTFNE  | NSSTLLECVA   | SICAQDYRGP  | ITIVVDDGS  | TNKTSEHAVC  |
|                | VDVI-P--NE  | -----L--C--  | S---Q-Y-G-- | -----VDDGS | -N-----     |
|                |             |              |             |            |             |
| ROT_NODC_BRAJA | RIYASDPRFS  | FILLANNVGK   | RKAQIAAIRS  | SSGDLVLNVD | SDTILAADVV  |
| ROT_NODC_RHIS3 | DNVAGDPRFD  | FILLPENVGK   | RKAQIAAIRR  | SSGDLVLNVD | SDTILASDVI  |
| ROT_NODC_RHISN | DHYACDPRFR  | FILMPKNVGK   | RKAQIVAIRE  | SSGDLVLNVD | SDTTIAPDVV  |
| ROT_NODC_RHILV | AAAYADDERFN | FTILPKNVGK   | RKA.IAAITQ  | SSGDLILNVD | SDTTIAPDVV  |
| ROT_NODC_AZOCA | DKYASDERFI  | FVELDQNKGT   | A.AQMEAIRR  | TGDLILNVD  | SDTVIDKDVV  |
|                | ---A-D-R--  | F-----N-G-   | --A-----    | --GDL-LNVD | SDT-----DV- |
|                |             |              |             |            |             |
| ROT_NODC_BRAJA | TKLVLMHDP   | GIGAAMGQLI   | ASNRNQTWLT  | RLIDMEYWLA | CNEERAAQAR  |
| ROT_NODC_RHIS3 | RKLARKMQDP  | AIGAAMGQLT   | ASNRSDTWLT  | RLIDMEYWLA | CNEERAAQAR  |
| ROT_NODC_RHISN | TKLALKMYS   | P AVGAAMGQLT | ASNRSDTWLT  | RLIDMEYWLA | CNEERAAQAR  |
| ROT_NODC_RHILV | SKLAHKMRDP  | AVGAAMGQMK   | ASNQADTWLT  | RLIDMEYWLA | CNEERAAQAR  |
| ROT_NODC_AZOCA | TKLASSMRAP  | NVGVMGQLV    | AKNRSWLT    | RLIDMEYWLA | CNEERIAQSR  |
|                | -KL---M--P  | --G--MGQ--   | A-N-----WLT | RLIDMEYWLA | CNEER--Q-R  |
|                |             |              |             |            |             |
| ROT_NODC_BRAJA | FGAVMCCCGP  | CAMYRRSALA   | LLDQYEAQF   | FRGKPSDFGE | DRHLTILMLK  |
| ROT_NODC_RHIS3 | FGAVMCCCGP  | CAMYRRSLL    | SLDQYETOM   | FRGKPSDFGE | DRHLTILMLE  |
| ROT_NODC_RHISN | FGAVMCCCGP  | CAMYRRSALL   | LLDKYETQL   | FRGKPSDFGE | DRHLTILMLN  |
| ROT_NODC_RHILV | FGAVMCCCGP  | CAMYRRSAML   | SLDQYETQL   | YRGKPSDFGE | DRHLTILMLS  |
| ROT_NODC_AZOCA | FGVMCCCGP   | CAMYRRSAIT   | PLLAIEYHQT  | FLGRPSNFE  | DRHLTILMLK  |
|                | FG-VMCCCGP  | CAMYRRS---   | -LL--YE-Q-  | F-G-PS-FGE | DRHLTILML-  |

FIG. 2

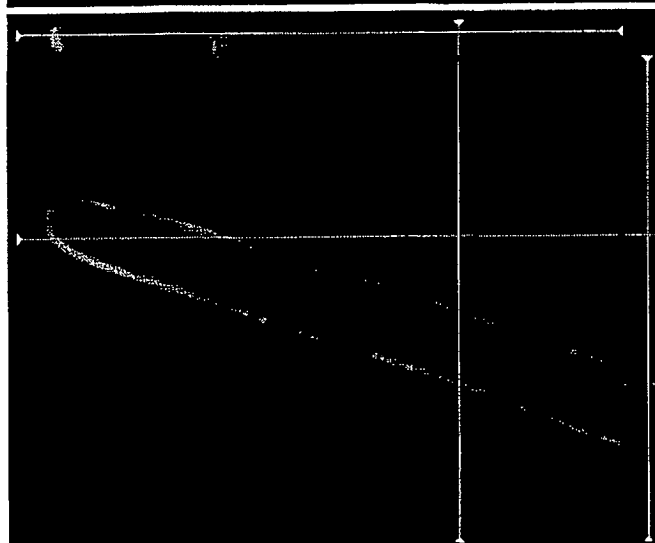
FIG. 2 continuação



A



B



C

FIG. 3

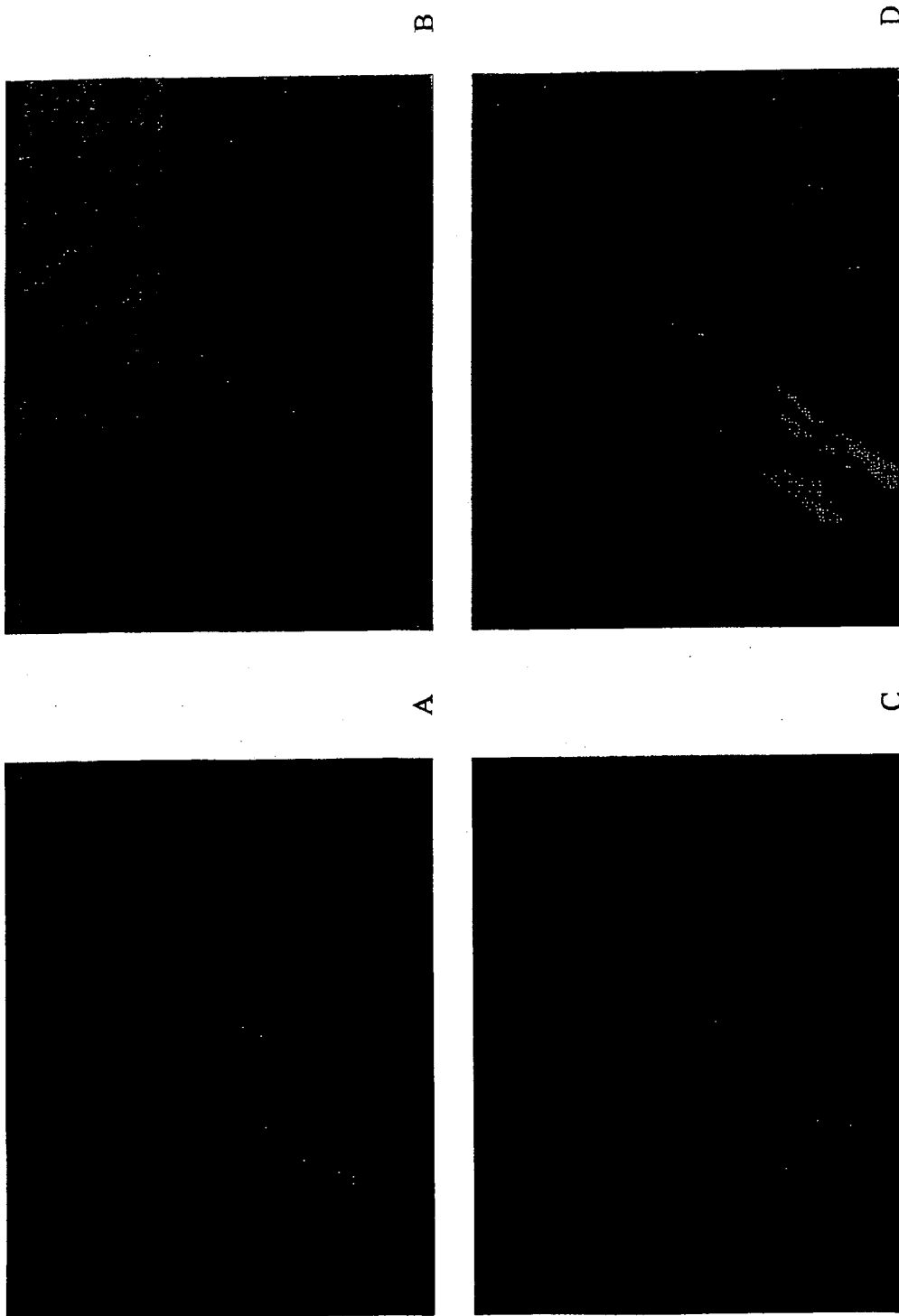


FIG. 4

B



A



FIG. 5

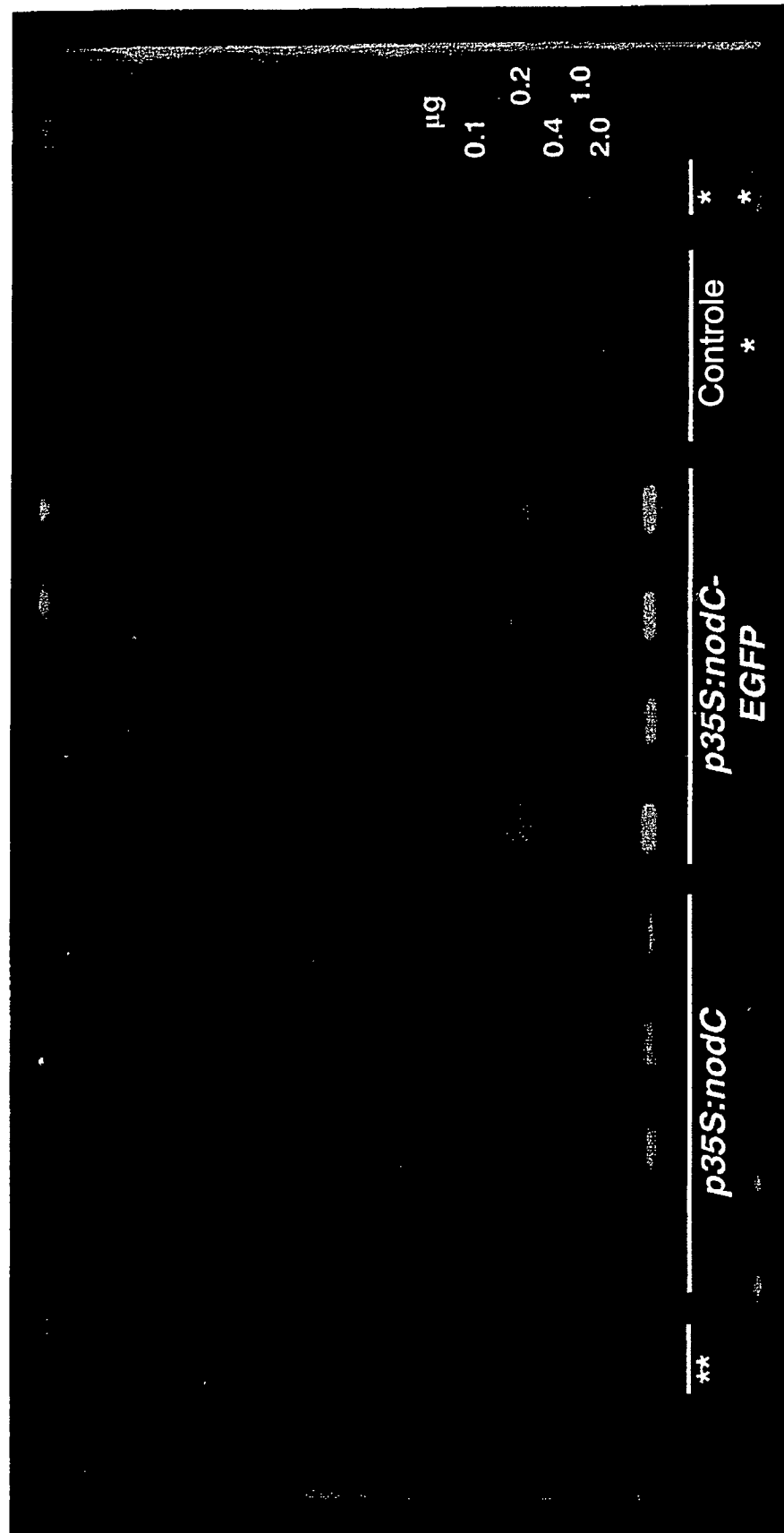
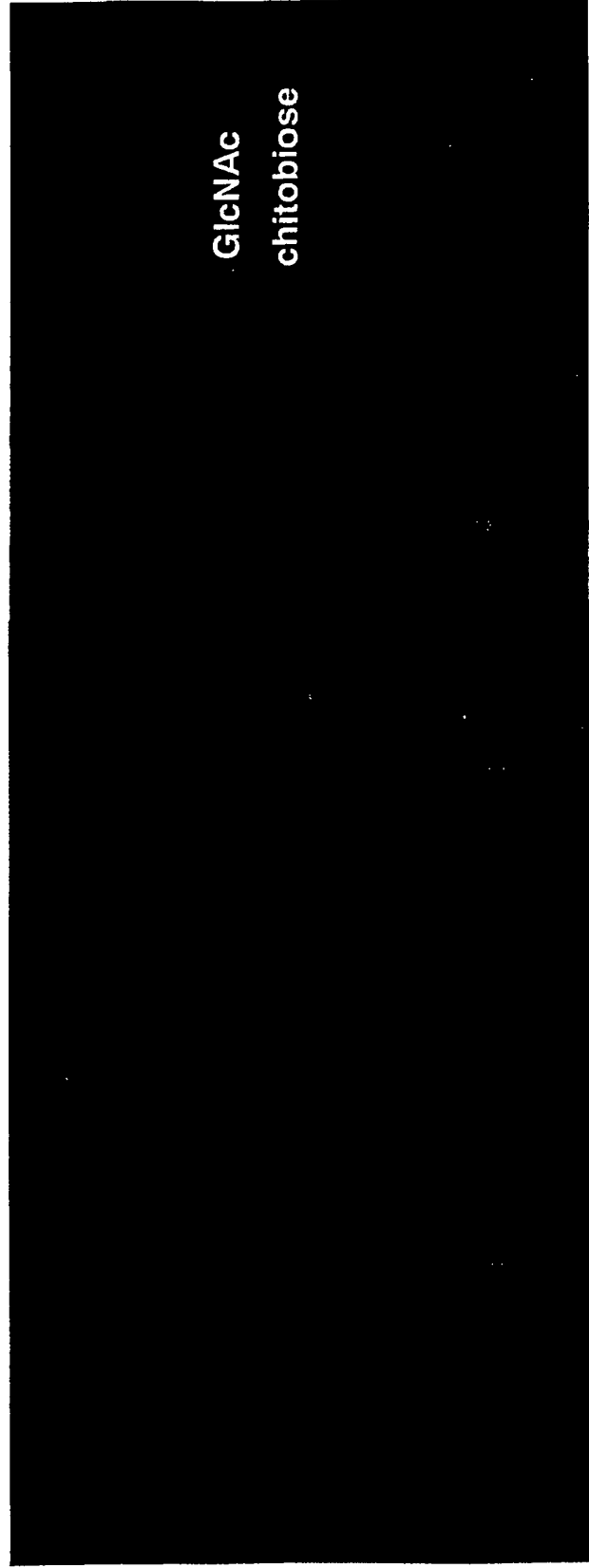


FIG. 6



GlcNAc  
chitobiose

A.

B.

FIG. 7

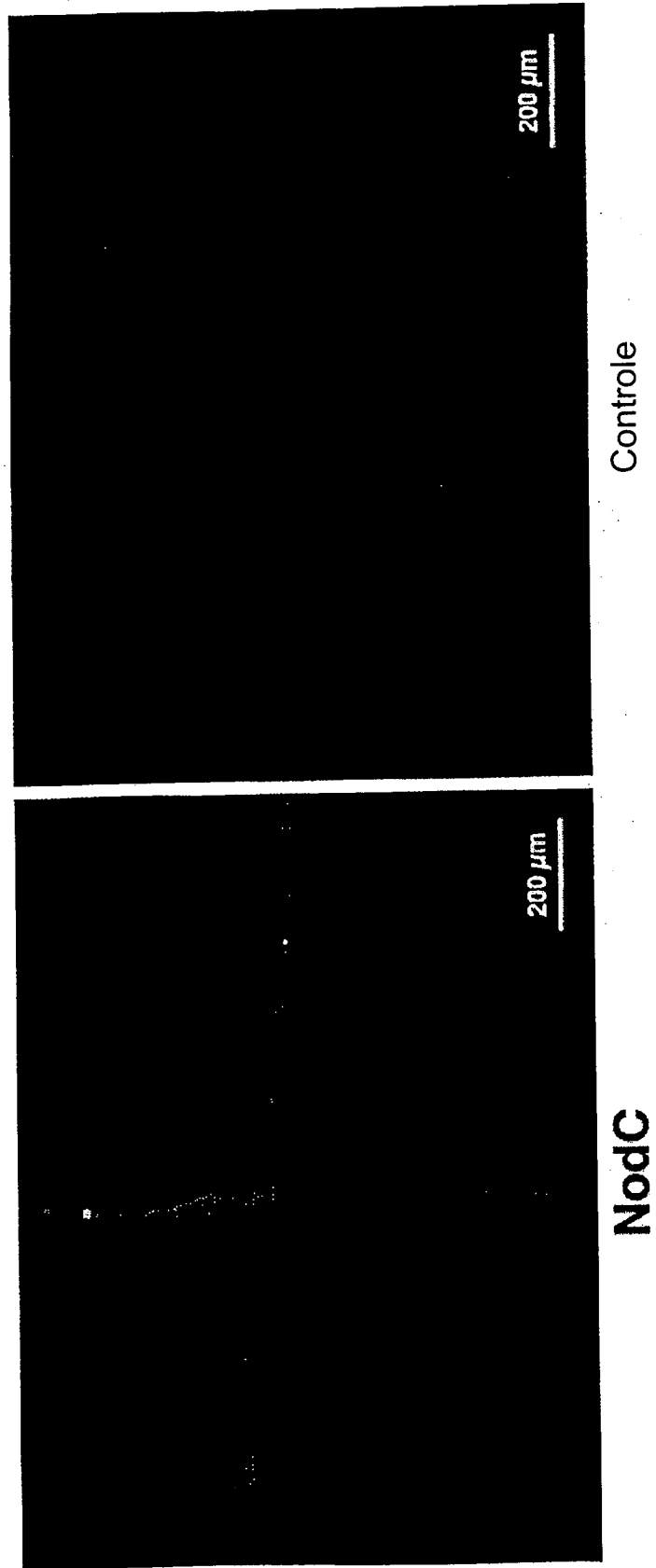


FIG. 8

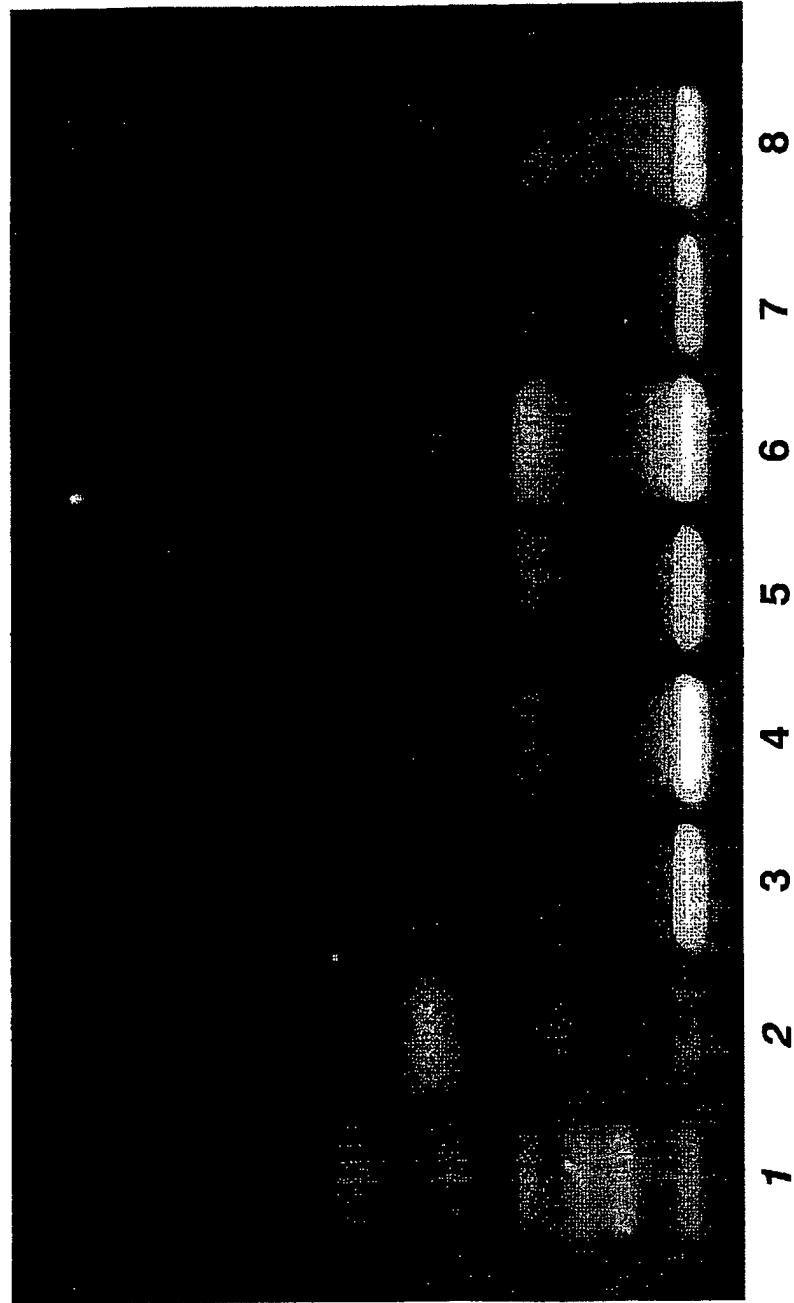


FIG. 9

P100131S3-0

## RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA ALTERAR A REATIVIDADE DE PAREDES CELULARES DE PLANTAS".**

5 A presente invenção refere-se a métodos e meios para a modificação da reatividade de paredes celulares de planta, particularmente, como podem ser encontradas em fibras naturais de plantas produtoras de fibra por inclusão de oligossacarídeos ou polissacarídeos positivamente carregados na parede celular. Isto pode ser convenientemente obtido ao expressar um gene quimérico que codifica uma N-acetilglicosamina transferase, particularmente uma N-acetilglicosamina transferase, capaz de ser marcada nas  
10 membranas do aparelho de Golgi em células de uma planta.