



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

(11) PI 9816263-2 B1

(22) Data do Depósito: 29/05/1998

(45) Data de Concessão: 16/08/2016



(54) Título: MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL COM UM GENE DE INTERESSE E DE PREPARAÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA FÉRTIL

(51) Int.Cl.: C12N 5/14; C12N 5/04; C12N 1/21; C12N 15/82; A01H 5/00

(30) Prioridade Unionista: 02/06/1997 US 08/867,869

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

(72) Inventor(es): GENEVIEVE HANSEN

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL COM UM GENE DE INTERESSE E DE PREPARAÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA FÉRTIL**".

5 Dividido do PI 9809899-3, depositado em 29.05.1998.

Esta invenção refere-se a um método de transformação de plantas usando *Agrobacterium*, mediante a realização da transformação na presença de um agente que iniba a necrose induzida por *Agrobacterium*, e/ou usando uma cepa de *Agrobacterium* que não induza necrose.

10 O primeiro método, e ainda um dos métodos mais amplamente usados, para a introdução de material genético estranho em plantas explora o sistema de transformação natural de *Agrobacterium* spp. usando plasmídios Ti (indutor de tumor) ou Ri (indutor de raiz) recombinantes, em que o T-DNA compreende um gene de interesse. O gene de interesse é incorporado
15 no material genético da planta pelo mesmo mecanismo que é usado no sistema natural para incorporar oncogenes ou genes da biossíntese de opina.

Embora a transformação com *Agrobacterium* funcione bem para plantas que sejam naturalmente infectadas e transformadas por *Agrobacterium* na natureza para formar tumores e/ou raízes pilosas, não funciona bem
20 para outras plantas. Por exemplo, sabe-se que elementos da família da grama (Gramineae), como o milho, não formam tumores após a exposição a *Agrobacterium* e geralmente se mostram extramamente recalcitrantes à transformação com *Agrobacterium*. Ishida et al., Nature Biotechnology (1996) 14:745-750, relataram a transformação de embriões de uma linhagem
25 de milho particular (A188) e seus híbridos usando *Agrobacterium* com vetores "superbinários", mas a reprodutibilidade desses resultados e a aplicabilidade desse sistema a outras linhagens de milho ou o uso de *Agrobacterium* com outros vetores não está claro. Também houve relatos de transformação com *Agrobacterium* do milho usando o meristema apical como tecido alvo,
30 mas a baixa eficiência do meristema apical como tecido alvo em comparação com, por exemplo, o calo embriogênico, tornam essa abordagem menos que ótima. Mesmo algumas plantas dicotiledôneas, como uvas, soja ou pi-

menta, que são suscetíveis à infecção por *Agrobacterium* e formação de tumor na natureza, se mostraram, todavia, difíceis de transformar no laboratório, porque os tecidos alvos preferidos para transformação e regeneração parecem responder de maneira ruim à exposição a *Agrobacterium*. A falta de
 5 entendimento quanto aos mecanismos de resistência à infecção por *Agrobacterium* e formação de tumor se mostraram um obstáculo para se projetar uma solução ou mesmo avaliar apropriadamente o problema da transformação com *Agrobacterium* em plantas recalcitrantes à transformação com *Agrobacterium*, como Gramineae.

10 Verificou-se agora, surpreendentemente, que *Agrobacterium* é capaz de induzir necrose apoptótica em células vegetais, particularmente da família Gramineae, por exemplo, milho. Métodos de seleção e geração de *Agrobacterium* que seja menos competente para induzir necrose foram descobertos, assim como métodos de inibição da resposta necrótica em células
 15 a serem transformadas.

A necrose observada em culturas de células de Gramineae após exposição a *Agrobacterium* é uma morte celular programada, pela qual a célula, aparentemente mediante um mecanismo de transdução de sinal, dirige sua própria morte. É distinta da morte celular passiva, isto é, necrose envolvendo rompimento da integridade da membrana e subsequente inchaço, que resulta em lise, por exemplo, conforme se observa após exposição a várias toxinas. Células que sofrem morte celular programada mostram alterações morfológicas características e fragmentação do DNA que, coletivamente, definem o processo da apoptose e são implementadas por um mecanismo que envolve expressão de gene de novo. As características estereotípicas da apoptose descritas em células animais são encolhimento, perda de contato célula a célula em tecidos organizados, condensação do núcleo e cromatina, fragmentação do DNA ("segmentação" do DNA) e formação de vesículas nucleares e na membrana. Demonstra-se que o co-cultivo de *Agrobacterium* com tecidos de milho ou trigo resulta em um processo intimamente análogo à apoptose em células animais, em que a morte celular se caracteriza por clivagem do DNA em fragmentos oligonucleossômicos e alte-

rações morfológicas definidas. Em células de milho expostas a *Agrobacterium*, o Ca^{2+} aumenta a intensidade da fragmentação do DNA, ao passo que Zn^{2+} tem o efeito oposto, o que corresponde ao efeito desses cátions divalentes nas endonucleases endógenas responsáveis pela clivagem de DNA durante a apoptose em células animais. Essa fragmentação também é diminuída pela adição de cicloheximida, o que evidencia que o processo requer expressão de gene de novo. A morte celular programada em resposta à exposição a *Agrobacterium* não havia sido anteriormente relatada.

Também se descobriu que essa necrose induzida por *Agrobacterium* (AIN) observada e Gramineae pode ser inibida com o uso de agentes inibidores de AIN, quer compostos químicos, como nitrato de prata, quer seqüências de nucleotídeos inibidoras de AIN integradas de maneira estável ou transitoriamente operacionais na célula a ser transformada. Também se descobriu, por triagem de coleções de *Agrobacterium*, que as cepas de *Agrobacterium* variam em sua capacidade de induzir necrose, de modo que se podem selecionar cepas que sejam adequadas para transformação de plantas recalcitrantes, como Gramineae.

Portanto, as várias modalidades da invenção incluem as seguintes:

1. Um método de transformação de uma célula vegetal com um gene de interesse, compreendendo a exposição da dita célula vegetal a *Agrobacterium* sob condições que inibam AIN, como a presença de um agente inibidor de AIN ou um tratamento de choque térmico, em que o dito *Agrobacterium* compreende um ou mais plasmídios (vetores) compreendendo um ou mais genes de interesse.

1.1. Em uma modalidade do método precedente, o agente inibidor de AIN é um inibidor químico. O inibidor químico é, de preferência, um composto selecionado no grupo que consiste em inibidores de etileno (por exemplo, 2,5-norbornadieno, norborneno, tiosulfato de prata e nitrato de prata), inibidores da síntese de etileno (por exemplo, aminoetoxivinilglicina (AVG), sais de cobalto, ácido acetil salicílico ou ácido salicílico), antagonistas da giberelina (por exemplo, ácido abscísico ABA)) e inibidores da fosfa-

tase (por exemplo, ácido ocadáico). Mais preferivelmente, o inibidor químico é um inibidor de etileno, de preferência nitrato de prata. Proteínas e peptídeos também podem agir como inibidores químicos. Os exemplos são proteínas de ocorrência natural, como DAD-1, os inibidores de bacilovírus da apoptose (IAPs), bacilovírus p35, ou análogos peptídicos sintéticos de caspases capazes de desencadear a apoptose. O inibidor químico está adequadamente presente em uma concentração eficaz, por exemplo, para o nitrato de prata, em uma concentração de 0,1 a 20 mg/l, de preferência de 1 a 10 mg/l.

1.2.1. Em uma modalidade alternativa desse método, o agente inibidor de AIN é uma seqüência de nucleotídeos. A seqüência de nucleotídeos inibidora de AIN pode inibir a AIN diretamente ou por codificação de uma mRNA inibidora de AIN que codifica uma proteína inibidora de AIN. Por exemplo, pode ser um oligonucleotídeo anti-sentido ou um gene que codifique mRNA anti-sentido, que seja anti-sentido com relação a um gene que codifique uma enzima associada à necrose (por exemplo, protease, quinase ou fosfatase) ou proteína reguladora. Alternativamente, pode compreender a região codificadora de um gene capaz de inibir a apoptose sob o controle de um promotor capaz de expressão em plantas, por exemplo, uma região codificadora de um gene bcl-1 de mamífero sob o controle de um promotor capaz de expressão em plantas, uma região codificadora de um gene inibidor da apoptose de um bacilovírus, como p35 ou pIAP, ou um gene capaz de suprimir a resposta de doença em plantas, por exemplo, nahG, dad-1 ou mlo. Uma seqüência de nucleotídeos inibidora de AIN que expresse uma proteína inibidora de AIN pode ser opcionalmente adaptada para expressão na planta hospedeira formando-se uma seqüência de nucleotídeos síntese que codifique a mesma proteína, mas usando códons que sejam preferidos pela planta hospedeira e evitando seqüências de nucleotídeos, por exemplo, sinais de poliadenilação ou sítios de junção dentro da região codificadora, que possam afetar a expressão ótima na planta hospedeira, por exemplo, de maneira análoga aos métodos descritos na US 5.380.831 ou US 5.610.042.

1.2.2. A seqüência de nucleotídeos inibidora de AIN pode ser

incorporada de maneira estável no genoma da planta a ser transformada ou pode estar apenas transitoriamente presente e operacional, por exemplo, no ou próximo ao momento em que a célula é exposta a *Agrobacterium*. A expressão transitória pode ser obtida, por exemplo, usando-se um sistema de agroinfecção, em que o T-DNA traz dois vírus gêmeos em tandem, de modo que um replicon viral que traga a sequência de nucleotídeos inibidora de AIN possa se replicar na célula. Nesse sistema, o vírus tipicamente não se integrará ao genoma da planta, mas se replicará em elevado número de cópias e proporcionará um alto nível de expressão transitória. Células assim ativadas para serem resistentes à necrose podem ser, então, transformadas usando-se *Agrobacterium* com plasmídios Ti compreendendo o gene de interesse, que será incorporado no genoma, ao passo que o vírus é diluído mediante regeneração e não será transmitido à semente. Assim, a descendência e os descendentes da planta infectada são transformados de maneira estável com o gene de interesse, mas não com a sequência de nucleotídeos inibidora de AIN. A expressão transitória pode ser alternativamente obtida por introdução de sequências de oligonucleotídeos inibidores de AIN curtas na planta, por exemplo, sequências anti-sentido.

1.3. Em uma modalidade alternativa adicional, a AIN é reduzida ou inibida por tratamento com choque térmico do tecido vegetal a ser transformado antes do co-cultivo com *Agrobacterium*. O tratamento de choque térmico é efetuado a 40 – 50°C, de preferência a 42 – 48°C, 45°C sendo uma temperatura preferida para o milho. O tratamento dura 2 – 10 minutos e, de preferência, 4 – 8 minutos.

2. Um método de preparação de uma planta transgênica fértil compreendendo a transformação de tecido vegetal pelo método 1 acima e regeneração do tecido assim transformado. De preferência, o tecido é selecionado dentre embriões imaturos ou calos embriogênicos, por exemplo, calo do tipo I do milho. Quando o tecido é um embrião imaturo, o método também compreende, de preferência, a colocação dos embriões em meio de iniciação de calo antes ou depois da exposição a *Agrobacterium* e a regeneração da planta a partir do calo embriogênico assim obtido. De preferência, o

gene de interesse (ou um deles) é um marcador selecionável ou identificável, permitindo a seleção ou identificação das células transformadas, tecido transformado e/ou plantas transformadas regeneradas.

3. O uso de um agente inibidor de AIN, por exemplo, um inibidor químico de AIN (por exemplo, um inibidor de etileno, por exemplo, nitrato de prata) ou uma seqüência de nucleotídeos inibidora de AIN (por exemplo, uma que codifique um mRNA ou proteína inibidora de AIN) em um método de transformação com *Agrobacterium* de uma planta ou seu tecido ou célula, ou um método de preparação de uma planta transgênica fértil, por exemplo, um método de acordo com 1 ou 2 acima.

4. Uma planta transgênica produzida pelo método de 2 acima, ou sua semente ou descendência.

5. Uma planta, tecido vegetal ou célula vegetal compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de origem heteróloga, que iniba AIN, por exemplo, uma seqüência de nucleotídeos sintética ou uma seqüência de nucleotídeos derivada do genoma de uma espécie de organismo diferente.

6. Uma cultura de células ou tecidos vegetais, por exemplo, para uso na transformação de Gramineae, compreendendo

- a) um inibidor químico de AIN,
- b) um *Agrobacterium* compreendendo um plasmídio que compreenda um gene de interesse, e
- c) água e sais essenciais.

O inibidor químico está adequadamente presente em uma concentração inibidora de necrose. O inibidor químico é, de preferência, um composto selecionado no grupo que consiste em inibidores de etileno (por exemplo, 2,5-norbornadieno, norborneno, tiosulfato de prata e nitrato de prata), inibidores da síntese de etileno (por exemplo, aminoetoxivinilglicina (AVG), sais de cobalto, ácido acetil salicílico ou ácido salicílico), antagonistas da giberelina (por exemplo, ácido abscísico ABA)) e inibidores da fosfatase (por exemplo, ácido ocadáico). Mais preferivelmente, o inibidor químico é nitrato de prata, por exemplo, em uma concentração de 0,1 a 20 mg/l, de preferência de 1 a 10 mg/l. A composição e a concentração ótimas de sais

essenciais são as conhecidas na técnica e podem variar ligeiramente dependendo da espécie, tipo e estágio de desenvolvimento das células ou tecido, mas são genericamente suficientes para que as concentrações de íons e nutrientes do meio (por exemplo, concentrações de nitratos, íons de potássio, fosfatos, íons de cálcio, íons de magnésio, íons de sódio e íons de cloro) sejam mantidas em níveis que sejam bem tolerados pelas células vegetais e pelo *Agrobacterium*. O meio de cultura também pode compreender, opcionalmente, nutrientes adequados (por exemplo, açúcares, por exemplo, sacarose), vitaminas, aminoácidos, hormônios e outros componentes (por exemplo, 2,4-D) conhecidos na técnica de cultura de células ou tecidos vegetais. A planta é, de preferência, da família Gramineae, por exemplo, milho. As células ou tecidos compreendem, de preferência, calos embriogênicos, por exemplo, calos do Tipo I ou do Tipo II.

7. Método de transformação de uma célula totipotencial de uma planta da família Gramineae, compreendendo a exposição de uma população de células totipotenciais ou tecido compreendendo células totipotentes a *Agrobacterium* compreendendo um ou mais plasmídios compreendendo um ou mais genes de interesse, em que o *Agrobacterium* é de uma cepa não induza níveis significativos de necrose na dita população a uma duração de exposição e a uma concentração suficientes para se conseguir a transformação das ditas células. O tecido é, de preferência, diferente do meristema apical, por exemplo, de preferência um tecido não diferenciado, por exemplo, embriões zigóticos ou calos embriogênicos plaqueados, de preferência calos embriogênicos durante a fase de iniciação (por exemplo, até 28 dias, de preferência até 14 dias após o plaqueamento em meio de iniciação), ou calos embriogênicos propagados em série, por exemplo, calos do Tipo I ou do Tipo II.

8. Método para a determinação da adequabilidade de uma cepa de *Agrobacterium* para uso na transformação de uma célula regenerável de uma planta da família Gramineae, compreendendo a exposição de uma população das ditas células regeneráveis da planta à cepa de *Agrobacterium* e observação ou determinação da quantidade de necrose na dita população

de células.

9. Cepa de *Agrobacterium* que tenha sido geneticamente modificada para reduzir ou eliminar a expressão do fator de necrose de *Agrobacterium* ou um derivado dessa cepa modificada. O fator de necrose de *Agrobacterium* é o fator termicamente lábil observado no sobrenadante concentrado capaz de induzir a necrose, por exemplo, morte celular programada, em embriões de milho. A incompatibilidade entre *Agrobacterium* e células de milho provavelmente envolve alguns componentes genéticos. A presente invenção descreve três genes de *Agrobacterium* envolvidos na resposta de morte celular de tecidos de milho. Eles são identificados por triagem de uma biblioteca BAC de *Agrobacterium*. Verificou-se que 3 BAC independentes provocam morte celular e mostram homologia com xylA-xylB, virB1 e acvB. É possível que os genes relatados sejam apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela incompatibilidade de *Agrobacterium* com tecidos de milho. A célula vegetal usada nos métodos da invenção é, de preferência, de uma espécie ou variedade de planta que não produza cecídios ou raízes pilosas após a transformação com *Agrobacterium*. De preferência, a espécie de planta é um elemento da família das gramíneas (Gramineae), mais preferivelmente milho ou trigo, particularmente milho. A célula vegetal é, de preferência, uma célula totipotente, isto é, uma célula que seja capaz de se regenerar em uma planta, de preferência uma planta fértil. Células totipotentes estão presentes, por exemplo, em embriões imaturos e calos embriogênicos. O tecido alvo é, de preferência, diferente do meristema apical. Mais preferivelmente, o tecido alvo compreende tecido não diferenciado, por exemplo, embriões zigóticos ou calos embriogênicos plaqueados. Os calos embriogênicos podem ser associadas ao embrião durante a fase de iniciação do calo (por exemplo, o período até 28 dias, de preferência até 14 dias, após o plaqueamento do embrião imaturo no meio de iniciação), ou podem ser calos embriogênicos propagáveis em série, por exemplo, calos do Tipo I ou do Tipo II. O calo do Tipo I de milho é um tecido preferido, compreendendo células totipotentes para uso na presente invenção. O *Agrobacterium* é selecionado, de preferência, dentre *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*. De preferência, a cepa de *Agrobacte-*

rium é uma cepa de *A. tumefaciens*, mais preferivelmente uma cepa que utilize nopalina. Quando a cepa de *Agrobacterium* é uma cepa de *A. rhizogenes*, é, de preferência, uma cepa que utilize agropina ou manopina. Mais preferivelmente, o *Agrobacterium* é um *Agrobacterium* que não induza necrose em Gramineae, por exemplo, um *Agrobacterium* selecionado dentre *A. tumefaciens* cepas A e B. *Agrobacterium* cepas A e B foram depositadas na Coleção Americana de Cultura de Tipo (ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852/USA, sob os números de Designação ATCC 55964 e 55965, respectivamente, em 2 de maio de 1997, de acordo com o Tratado de Budapeste. O gene de interesse é, de preferência, um gene para resistência a herbicidas, resistência a doenças ou resistência a insetos, ou é um marcador selecionável ou identificável, e compreende um promotor operacional na planta, uma região codificadora e uma região terminadora 3'. Genes de resistência a herbicidas incluem o gene AHAS para resistência a herbicidas de imidazolinona ou sulfonil uréia, o gene pat ou bar para resistência a bialafos ou glifosinato, o gene da EPSP sintase para resistência a glifosato, e outros. Genes de resistência a doenças incluem genes para enzimas para síntese de antibióticos, por exemplo, para enzimas para síntese de pirolnitrina, genes de resistência derivados de plantas, e outros. Genes de resistência a insetos incluem genes para proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*. Marcadores selecionáveis incluem genes de resistência a herbicidas e genes de resistência a antibióticos (por exemplo, higromicina ou canamicina), assim como marcadores selecionáveis positivos, como o gene para manose fosfato isomerase. Marcadores identificáveis incluem genes para enzimas prontamente ensaiáveis, como o gene gus e o gene cat. O plasmídio pode compreender mais de um gene de interesse e/ou o *Agrobacterium* pode compreender diferentes plasmídios com diferentes genes de interesse.

O termo necrose induzida por *Agrobacterium* (AIN), conforme aqui usado, refere-se a qualquer morte de célula vegetal mediada por *Agrobacterium*, mas inclui, particularmente, a morte celular programada induzida por *Agrobacterium*.

Exemplos

Exemplo 1 – Mecanismo de ação da necrose em milho exposto a *Agrobacterium*

- 5 a. Demonstração da necrose do milho, mas não de tabaco na presença de *Agrobacterium*

Calos embriogênicos e embriões de milho se mostraram tecidos particularmente difíceis para a transformação por *Agrobacterium*. Os experimentos a seguir empregam linhagens cruzadas de milho (*Zea mays* L.) HE/89 e uma linhagem aqui designada como Elite 1. O calo embriogênico

10 friável do milho linhagem HE/89 foi fornecido por Gunter Donn. HE/89 é descrito em Mórocz, S., Donn, G., Németh, J. e Dudits, D. (1990) Theor. Appl. Genet. 80:721-726. Elite 1 é uma linhagem de elite de propriedade da Novartis relacionada à B73. A cultura em suspensão de Elite 1 é iniciada a partir de um calo embriogênico friável selecionado dentre embriões imaturos. A

15 linhagem HE/89 é cultivada em um meio N6 líquido modificado, acrescentado de 500 mg/l de Bacto triptona, 30 g/l de sacarose e 0,5 mg/l de ácido 2,4-diclorofenóxi acético (2,4-D) (N6M). A linhagem Elite 1 é cultivada em meio líquido N6 (Chu et al., 1975) suplementado com 30 g/l de sacarose e 2 mg/l de 2,4-D (2N63S). A linhagem celular de *Nicotiana tabacum* NT-1 cultivada

20 em meio Murashige e Skoog suplementado com 2 mg/l de 2,4-D e sacarose (30 g/l) (MS3S) é usada como um controle suscetível a *Agrobacterium*. As culturas em suspensão são mantidas em meio líquido em um agitador rotativo (120 rpm) e sua subcultivadas a cada 7 dias.

As bactérias são cultivadas em meio YP (5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, pH 6,8) durante 24 h a 28°C. As

25 bactérias são centrifugadas e ressuspensas no meio para plantas apropriado. Para a inoculação de células vegetais Elite 1, HE/89 e NT-1, as bactérias são ressuspensas, respectivamente, em meio líquido 2N63SM, N6M e MS3S.

30 Logo após a inoculação do calo embriogênico de milho, muitas das células se tornam necróticas (Tabela 1). A necrose é observada mesmo após a transferência dos calos embriogênicos tratados para um meio livre de

bactérias e contendo cefotaxima. O co-cultivo de células de milho com culturas muito diluídas de *Agrobacterium* durante um tempo muito curto é suficiente para induzir uma resposta necrótica ou inibição do crescimento do milho cruzado Elite 1. Para calos embriogênicos de HE/89, um curto tempo de co-cultivo reduz a alteração necrótica em alguma medida, mas não evita completamente a necrose. Em experimentos de controle, a cefotaxima não faz com que o tecido de milho se torne necrótico. Assim, parece que o efeito necrótico é uma consequência da interação entre *Agrobacterium* e calos de milho. Como controle, células de tabaco NT-1 também são inoculadas com *Agrobacterium* e nenhuma necrogênese é observada.

Tabela 1: Co-cultivo de células vegetais em suspensão com LBA4404

	HE/89			Elite		
	2 dias	4 dias	7 dias	2 dias	4 dias	7 dias
Sem <i>Agrobacterium</i>	-	-	-	-	-	-
OD=0,2						
10 minutos	-	-	+	-	+	+
1 hora	-	-	+	+	+	++
24 horas	-	+	+	+	+	++
48 horas	+	+	++	+	++	+++
OD=1						
10 minutos	-	+	+	+	+	+
1 hora	-	+	+	+	+	++
24 horas	+	+	++	+	++	++++
48 horas	+	+	++	++	+++	++++

Calos embriogênicos friáveis de milho HE/89 e de um milho cruzado de elite registrado mantidos em meio líquido são incubados com *Agrobacterium* durante 10 min, 1 h, 24 h ou 48 h antes da transferência para o meio contendo cefotaxima. 50 µl de bactérias, à densidade óptica indicada (OD = 600 nm), são adicionados a 10 ml de meio de cultura de tecido contendo 1 ml de volume de células compactado. Se a cultura tiver de ser incubada durante mais do que dois dias, as bactérias são lavadas e as células

vegetais são ressuspensas no mesmo meio, suplementado com cefotaxima (250 mg/l). A presença ou ausência de necrose é avaliada 2, 4 e 7 dias após a inoculação, e a intensidade relativa da necrose é expressada da seguinte maneira: +, formação rara de necrose; ++, necrose fraca; +++, necrose forte; +++++, necrose muito forte.

b. Evidência de morte celular programada

Para se determinar o mecanismo de morte celular induzido por *Agrobacterium* em tecidos de milho, DNA genômico é extraído de células vegetais em suspensão colhidas 24 ou 48 horas após a inoculação com *Agrobacterium*. A exposição a *Agrobacterium* causa fragmentação do DNA em ambas as linhagens de milho, com um padrão característico de fragmentação internucleossômica, o que é considerado uma indicação precoce de morte celular programada. Células de milho e células de tabaco de controle, mantidas apenas em meio de cultura, não mostram fragmentação de DNA sob essas condições. A inoculação de células de milho com *E. coli* ou com células de *Agrobacterium* autoclavadas não causa fragmentação de DNA. Além disso, células de milho que sofreram morte celular programada não puderam induzir a morte celular de tecidos embriogênicos de milho frescos.

Evidências adicionais de que *Agrobacterium* induz fragmentação de DNA são obtidas investigando-se a sensibilidade do processo a Zn^{2+} e Ca^{2+} . Na linhagem celular HE/89, Ca^{2+} aumentou a intensidade de fragmentos de DNA, ao passo que Zn^{2+} reduziu acentuadamente a fragmentação genômica. Essas características são totalmente consistentes com o efeito desses cátions divalentes nas endonucleases endógenas responsáveis pela clivagem do DNA durante a apoptose em sistemas animais. A intensidade da fragmentação também é diminuída pela adição de cicloheximida, evidência de que o processo requer expressão de gene de novo. Esses resultados indicam que o contato de *Agrobacterium* com células de milho é responsável pela morte celular de tecidos de milho. A fragmentação do DNA durante a apoptose também é detectada in situ por reagentes que reagem com as hidroxilas expostas nas unidades nucleossômicas. Embriões de milho de 12 dias de idade de uma linhagem de elite registrada descendente da Lancaster

são inoculados com LBA4404 e plaqueados em meio DG4 suplementado com cloramben. Koziel, M. G., et al., 1993, Bio/Technology 11:194-200. Células apoptóticas são detectadas por coloração in situ com o kit TACS-1 (Trevigen), que envolve a marcação da extremidade dos fragmentos de DNA pela enzima Klenow usando dNTP conjugado a um marcador detectável, fornecendo um precipitado insolúvel escuro, indicativo de fragmentação genômica. Cullivier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutking, J. S. e Spiegel, S. (1996) Nature 381, 800-803. Os embriões são embebidos em solução de formaldeído a 3,7% e processados conforme descrito pelo fabricante. Para detectar a clivagem de DNA genômico in situ, embriões fixados são tratados com o kit TACS-1. Seções transversais fixadas são primeiro tratadas com proteinase K durante 5 min à temperatura ambiente e, então, meruglhadas durante 5 min em peróxido de hidrogênio a 2% para remover a peroxidase endógena. Após uma breve lavagem com tampão de Klenow, os tecidos foram, então, incubados durante 1 h a 37°C com a enzima Klenow, que pode incorporar desoxinucleotídeos modificados exógenos nas terminações 5' dos fragmentos clivados. Um precipitado insolúvel escuro, indicativo de apoptose, que aparece na célula individual é detectável com um microscópio.

Células tratadas com *Agrobacterium* se tornam escurecidas e de formato distorcido após 48 h de exposição. Embriões de controle, mantidos em meio de cultura apenas ou inoculados com *E. coli*, não mostram nenhum precipitado sob essas condições. Também se verificou que nem todos os tecidos de milho reagem de maneira igual a uma infecção por *Agrobacterium*: rebentos permanecem intactos, ao passo que embriões se tornam necróticos. A fragmentação do DNA também é observada com cepas de *Agrobacterium* curadas do plasmídio patogênico (cepas A136 e LBA4402), sugerindo que o fator que induz a morte celular programada não está relacionado ao plasmídio. A morte celular programada também é observada quando embriões de milho são incubados durante 20 minutos com sobrenadante concentrado 20 vezes de um *Agrobacterium* indutor de morte celular (cepa LBA 4404), mas não quando os embriões são contactados com sobrenadante

preparado da mesma maneira com *E. coli*. A morte celular programada também não ocorre se o sobrenadante de *Agrobacterium* concentrado for aquecido durante 20 minutos a 100°C antes da incubação.

Calos embriogênicos de milho freqüentemente contêm áreas de células ainda aparentemente vivas e outras áreas que estão necróticas. O fato de apenas áreas limitadas morrerem, mesmo em situações em que células fora da área responsiva sejam simultaneamente expostas ao estímulo, sugere que existe uma diversidade temporal ou permanente nos elementos que controlam a resposta de células individuais a diferentes estímulos em tecidos organizados. O número de células em um tecido organizado que sofrem morte celular programada pode ser pequeno em comparação com a massa total, e o processo pode ser assíncrono. A indução de PCD em uma ou algumas poucas células em uma dada área ou tecido pode desencadear a rápida morte de células circundantes, conforme observados em células animais, e estas últimas células podem não mostrar o fenótipo de morte celular programada, mas, todavia, morrerem.

Exemplo 2: Inibição da morte celular programada induzida por *Agrobacterium*

Preparação de tecidos para inoculação com *Agrobacterium*:

Embriões imaturos (1,2 a 2,2 mm de comprimento) são assepticamente excisados 14 – 15 dias após a polinização de espigas cultivadas em estufa e com a superfície esterilizada e plaqueados com o escutelo para cima em meio de iniciação de calo, 2DG4 + 5 mg/l de cloramben (2DG4-5Chl). O meio 2DG4 é o meio de Duncan modificado para conter 20 mg/l de sacarose.

Embriões com resposta de calo:

Embriões imaturos são esterilizados conforme acima descrito, e plaqueados em meio de iniciação de calo (2DG4-5Chl) e aí cultivados durante 1 a 7 dias. O tecido resultante é usado como amostra para inoculação.

30 Calo do tipo I jovem:

Embriões plaqueados em meio de iniciação de calo (2DG4 + 5 Cloramben) durante 7 a 20 dias dão origem a calos. Esses calos são calos

do tipo I típicos para o milho cruzado usado, que são aglomerados compactos e relativamente bem organizados de células. Os calos embriogênicos resultantes são cortados dos embriões e transferidos para meio de manutenção de calo, 2DG4 + 0,5 mg/l de ácido (2,4-diclorofenóxi) acético (2,4-D) e usados como amostras para inoculação.

Calo do Tipo I:

O calo do tipo I obtido pelo método acima descrito pode ser mantido no meio de manutenção (2DG4 + 2,4 D a 0,5 mg/l) e subcultivados a cada 2 semanas.

10 *Agrobacterium*:

A. tumefaciens cepa LBA4404 (pAL4404, pSB1) é usado nesses experimentos. pAL4404 é um plasmídeo auxiliador desarmado. pSB1 é um plasmídeo de ampla gama de hospedeiros, que contém uma região de homologia com pGIGUP e um fragmento KpnI de 15,2 kb da região de virulência do pTiBo542 (Ishida et al., 1996; High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Nature Biotechnology 14, 745-750). A introdução do plasmídeo pGIGUP por eletroporação em LBA4404 (pAL4404, pSB1) resulta em uma co-integração de pGIGUP e pSB1. O T-DNA desse plasmídeo contém um gene PAT expressável em plantas acionado pelo promotor da ubiquitina, para conferir resistência a fosfinotricina, e um gene para GUS com um íntron no códon N terminal da sequência de codificação acionada pelo promotor Gelvin. Esse gene íntron-GUS expressa atividade GUS na célula vegetal, mas não em *Agrobacterium*.

Crescimento bacteriano:

25 *Agrobacterium* é cultivado durante 3 dias em meio YP (5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de ágar, pH 6,8) suplementado com 50 mg/l de espectinomicina e 10 mg/l de tetraciclina. As bactérias são coletadas com uma alça e postas em suspensão em meio líquido N6, a uma densidade que varia de 10^9 a 5×10^9 células/ml. As células de *Agrobacterium* também podem ser coletadas de uma cultura de uma noite em meio YP e ressuspensas em meio líquido N6.

Co-cultivo na presença ou ausência de nitrato de prata:

Tecidos de milho preparados conforme acima descrito são inoculados com *Agrobacterium*. Tecidos de milho são embebidos na suspensão bacteriana durante 5 - 10 min e, então, plaqueados em meio com ou sem nitrato de prata (1 a 10 mg/l). Os tecidos também são inoculados com uma gota de 5 µl com 10^9 a 5×10^9 células/ml de uma suspensão de *Agrobacterium* colocada em cima do tecido. Após a inoculação, os tecidos de milho são cultivados no escuro a 25°C, com ou sem nitrato de prata no meio (1 a 10 mg/l). 2 ou 3 dias após a inoculação, os tecidos são transferidos no mesmo meio, suplementado com cefotaxima (250 mg/l) com ou sem nitrato de prata.

10 Resultados:

Sensibilidade de embriões de milho e calos embriogênicos de milho a *Agrobacterium*.

Calos embriogênicos podem se desenvolver a partir de embriões de milho quando plaqueados em meio de iniciação de calo. A linhagem celular desenvolvida a partir de embriões permanece altamente embriogênica quando mantida em meio contendo 2,4-D. Avalia-se a sensibilidade desses calos embriogênicos e embriões de uma linhagem cruzada de milho a *Agrobacterium* LBA4404. A formação de uma acentuada cor marrom no tecido é observada após o co-cultivo de *Agrobacterium* e tecidos de milho. Essa reação também é observada com LBA4402 que tenha sido curado de seu plasmídeo patogênico. Embriões de controle e calos embriogênicos que são co-cultivados com *Escherichia coli* e submetidos aos mesmos procedimentos não exibem morte celular ou coloração marrom significativa. Assim, parece que a morte celular é uma consequência da interação entre células de milho e *Agrobacterium*. Parece que os embriões são mais sensíveis a *Agrobacterium* do que calos embriogênicos. Uma concentração de 10^9 células/ml é suficiente para induzir a morte celular. Além disso, uma curta exposição (5 min) é suficiente para induzir essa reação.

Determina-se o efeito da adição de nitrato de prata ao meio de co-cultivo e ao meio de iniciação de calo. A adição de nitrato de prata permite a recuperação de tecidos saudáveis (Tabelas 2 e 3). Cerca de 50% dos embriões plaqueados em meio contendo nitrato de prata são capazes de

produzir calos embriogênicos. O efeito ótimo é obtido com embriões plaqueados em meio de iniciação de calo durante pelo menos 2 dias antes da inoculação com *Agrobacterium*. Verificou-se que a combinação desses dois fatores previne drasticamente a necrose de calos embriogênicos de milho após co-cultivo com *Agrobacterium*.

A coloração marrom reduzida dos calos embriogênicos se correlaciona com a iniciação do calo e sobrevivência do tecido após inoculação com *Agrobacterium*. Cerca de 80% dos embriões de controle não tratados com *Agrobacterium* dão origem a calos embriogênicos.

O efeito do nitrato de prata também é observado com calos do tipo I inoculados com *Agrobacterium* (Tabela 3). Parece que uma linhagem jovem é mais resistente à inoculação com *Agrobacterium*, e um pré-tratamento com nitrato de prata melhora a recuperação de tecidos saudáveis.

Para se verificar que a presença do nitrato de prata durante o co-cultivo não reduz a virulência do *Agrobacterium*, discos de folhas de tabaco são inoculados com LBA4404 (GIGUP) a uma concentração de 10^9 células/ml. Nenhuma diminuição significativa da atividade de GUS é observada nas folhas de tabaco.

Tabela 2: Inoculação de embriões de milho com LBA4404

Embriões e embriões com respostas de calo embriogênico são inoculados com *Agrobacterium* LBA4404 (GIGUP) (10^9 células/ml). O meio básico é 2DG4 + 5 Cloramben (2DG4). Todos os tratados são feitos com cerca de 80 a 100 embriões e repetidos duas vezes. A iniciação do calo é avaliada duas semanas após a inoculação.

Pré-tratamento (tempo)	Meio de co-inoculação	Transferência	Contagem
Sem pré-tratamento	2DG4	2DG4 + Cef	1 %
Sem pré-tratamento	2DG4	2DG4 + AgNO ₃ + Cef	30 %
Sem pré-tratamento	2DG4 + AgNO ₃	2DG4 + AgNO ₃ + Cef	55 %
2DG4+AgNO ₃ (1 dia)	2DG4 + AgNO ₃	2DG4 + AgNO ₃ + Cef	43 %
2DG4+AgNO ₃ (4 dias)	2DG4 + AgNO ₃	2DG4 + AgNO ₃ + Cef	27 %

2DG4 (6 dias)	2DG4 + AgNO ₃	2DG4 + AgNO ₃ + Cef	65 %
2DG4 (6 dias) + 1 dia em 2DG4 + AgNO ₃	2DG4 + AgNO ₃	2DG4 + AgNO ₃ + Cef	88 %

Tabela 3: Inoculação de calo do tipo I de milho

Calos do tipo I são inoculados com *Agrobacterium* LBA4404 (GIGUP) (10^9 células/ml). O meio básico usado nesses experimentos é 2DG4 + 0,5 2,4D (2DG4), com ou sem nitrato de prata (AgNO₃). Todos os experimentos são feitos com cerca de 150 pedaços de calos do tipo I. A sobrevivência dos tecidos é avaliada 2 semanas após a inoculação.

Calo do tipo I	Pré-tratamento	Co-inoculação	Transferência	Contagem
½ mês de idade	2DG4	2DG4+AgNO ₃	2DG4+Ag-NO ₃ +Cef	75 %
	2DG4+AgNO ₃ 2DG4	2DG4+AgNO ₃ 2DG4	2DG4+AgNO ₃ +Cef f 2DG4+Cef	95 % 22%
10 meses de idade	2DG4	2DG4+AgNO ₃	2DG4+Ag-NO ₃ +Cef	55 %
	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃	2DG4+Ag-NO ₃ +Cef	66 %
	2DG4	2DG4	2DG4+Cef	12 %

Exemplo 3: Transformação por *Agrobacterium* de embriões zigóticos imaturos e isolamento de calos transformados com o uso de fosfotricina, higromicina ou manose como agente de seleção.

Embriões imaturos são obtidos aproximadamente 10 a 14 dias após a autopolinização. Os embriões zigóticos imaturos são divididos entre diferentes placas contendo meios capazes de induzir e sustentar a formação de calo embriogênico, a cerca de 25 embriões imaturos por placa.

Os embriões imaturos são inoculados na placa ou em líquido, conforme indicado no exemplo 2, com *Agrobacterium* com um plasmídeo Ti compreendendo um gene marcador selecionável. Mediante uma série de experimentos, desenvolvem-se condições otimizadas para embriões imaturos. Em uma condição otimizada, os embriões imaturos são plaqueados em

meio de iniciação de calo contendo nitrato de prata (10 mg/l), antes ou imediatamente após a inoculação com *Agrobacterium*. Aproximadamente 25 embriões imaturos são colocados em cada placa. 16 a 72 horas após a inoculação, os embriões imaturos são transferidos para meio de iniciação de
5 calo com nitrato de prata e cefotaxima. A seleção de células transformadas é realizada da seguinte maneira:

a. Marcador resistente a PPT: a transformação é realizada usando-se uma cepa de *Agrobacterium* portadora de um plasmídio com um gene que codifica a resistência a fosfinotricina na região de T-DNA. As células transformadas são selecionadas in vitro por aplicação de fosfinotricina a
10 uma concentração de 3 mg/l 2 a 20 dias após a inoculação e mantidas durante um total de 2 – 12 semanas. O calo embriogênico assim obtido é regenerado na presença ou ausência de fosfinotricina em meio de regeneração padrão. Todas as plantas são testadas pelo teste com vermelho clorofenol (CR) quanto à resistência a PPT. Esse ensaio utiliza um corante indicador sensível a pH para mostrar quais células estão crescendo na presença de
15 PPT. As células que crescem produzem uma alteração de pH no meio e tornam o indicador Vermelho Clorofenol amarelo (de vermelho). Plantas que expressam o gene de resistência a PPT são facilmente identificadas nesse teste. Plantas positivas pelo teste com CR são ensaiadas por PCR quanto à
20 presença do gene PAT. Plantas que sejam positivas para o teste PCR são analisadas por transferência Southern.

b. Marcador de resistência à higromicina: a transformação é realizada usando-se uma cepa de *Agrobacterium* portadora de um plasmídio
25 com um gene (hpt, higromicina B fosfotransferase) que codifica a resistência à higromicina na região de T-DNA. As células transformadas são selecionadas usando-se higromicina a uma concentração de 3 mg/l 2 a 20 dias antes da inoculação e mantidas durante um total de 2 – 12 semanas. O calo embriogênico assim obtido é regenerado na presença ou ausência do agente
30 selecionável em meio padrão de regeneração. Todas as plantas são testadas quanto à resistência à higromicina. Plantas que expressam o gene de resistência à higromicina são facilmente identificados nesse teste. Plantas

positivas por esse teste são ensaiadas por PCR quanto à presença do gene hpt. Plantas que sejam positivas pelo teste PCR são analisadas por transferência Southern.

- c. Seleção positiva com manose: a transformação é realizada usando-se uma cepa de *Agrobacterium* portadora de um plasmídeo com um gene (manose fosfato isomerase) que codifica a tolerância à manose na região de T-DNA, a manose é usada para selecionar células transformadas in vitro. Essa seleção pode ser aplicada a tão baixo quanto 1 g/l 2 a 20 dias após a inoculação e mantida durante um total de 2 – 12 semanas. O calo embriogênico assim obtido pode ser regenerado na presença ou ausência de manose em meio padrão de regeneração. Todas as plantas são testadas pelo teste de vermelho clorofenol (CR) quanto à tolerância à manose. Esse ensaio utiliza um corante indicador sensível a pH para mostrar quais células estão crescendo na presença de manose. As células que crescem produzem uma alteração de pH no meio e tornam o indicador Vermelho Clorofenol de vermelho em amarelo. Plantas que expressam tolerância a manose são facilmente identificadas nesse teste. Plantas positivas pelo teste de CR são ensaiadas por PCR quanto à presença do gene de manose. Plantas que sejam positivas para o teste de PCR são analisadas por transferência Southern.

Exemplo 4: Transformação por *Agrobacterium* de calos derivados de embriões zigóticos imaturos e isolamento de calos transformados com o uso de fosfinotricina, higromicina e manose como agentes selecionáveis.

- O calo do tipo I é obtido a partir de embriões zigóticos imaturos usando-se técnicas de cultura padronizadas. Aproximadamente 25 pedaços de calo do tipo I são colocados em meio de manutenção contendo nitrato de prata, antes ou após a inoculação com *Agrobacterium*. A inoculação pode ser efetuada conforme descrito no exemplo 2. Aproximadamente 16 – 72 horas após a inoculação, o calo é transferido para meio de cultura padrão contendo nitrato de prata e cefotaxima. A seleção pode ser aplicada imediatamente após a transferência para esse meio ou 1 a 20 dias depois. O calo

é, então, subcultivado em seleção durante aproximadamente 2 a 12 semanas, após as quais calos sobreviventes e em crescimento são transferidos para meio de regeneração padronizado para a produção de plantas.

A seleção é realizada como no exemplo precedente para células transformadas com genes para resistência a fosfinotricina, resistência a higromicina ou manose fosfato isomerase.

Exemplo 5: Transformação de calos do tipo I de milho por inoculação com *Agrobacterium* e isolamento de calos transformados com o uso de fosfinotricina, higromicina e manose como agentes selecionáveis.

O calo é derivado do plaqueamento de embriões imaturos do genotipo elite. As culturas são subcultivadas bimensalmente em meio de manutenção (2DG4 + 0,5 mg/l de 2,4-D), e os grumos de células colhidos 2 – 3 dias após a subcultura são colocados em meio 2DG4. Depois ou antes da inoculação com *Agrobacterium*, os grumos de células são plaqueados em meio 2DG4 contendo nitrato de prata. A inoculação com *Agrobacterium* pode ser efetuada conforme descrito no exemplo 2. Após 16 a 72 horas de incubação, o calo é transferido para meio de manutenção fresco contendo cefotaxima e nitrato de prata. O calo é subcultivado em seleção durante um total de aproximadamente 2 – 12 semanas com o agente selecionável, após as quais calos sobreviventes e em crescimento são transferidos para meio de regeneração padronizado para a produção de plantas. A seleção é realizada como no exemplo precedente para células transformadas com genes para resistência a fosfinotricina, resistência a higromicina ou manose fosfato isomerase.

Exemplo 6: O tratamento com choque térmico evita a apoptose desencadeada por *Agrobacterium*

Embriões imaturos:

Linhagens cruzadas de milho são cultivadas em estufa. Embriões imaturos (0,8 a 2,2 mm de comprimento) são assepticamente excisados de espigas de superfície esterilizada entre 8 e 15 dias após a polinização, dependendo de fatores ambientais. Os embriões são plaqueados com o escutelo para cima em meio de iniciação de calo. Para a maioria das linhagens

cruzadas, os embriões são plaqueados em meio LS (Linsmaier e Skoog, *Physiol. Plant.* 18: 100-127, 1965). Os embriões de CG00526 são plaqueados em 2DG4 + 5 mg/l de cloramben (2DG4-5Chl). O meio 2DG4 é o meio de Duncan modificado para conter 20 mg/l de sacarose (Koziel et al., *Bio/Technology* 11:194-200, 1993).

Calo do tipo I:

Embriões imaturos são esterilizados conforme acima descrito e plaqueados em meio de iniciação de calo (2DG4-5Chl) e aí cultivados durante 1 a 7 dias. Embriões plaqueados em meio de iniciação de calo (2DG4 + 5 Chl) durante 7 a 20 dias dão origem a calos. Esses calos são calos do tipo I típicos. Calos do tipo I são aglomerados compactos de células relativamente bem organizadas. O calo embriogênico resultante é cortado dos embriões e transferido para meio de manutenção de calo, 2DG4 + 0,5 mg/l de ácido 2,4-diclorofenóxi acético (2,4-D), e usado para inoculação. O calo do tipo I obtido pelo método acima descrito pode ser mantido no meio de manutenção (2DG4 + 2,4 D a 0,5 mg/l) e subcultivado aproximadamente a cada 2 semanas.

Agrobacterium:

A cepa usada é *A. tumefaciens* LBA4404 (pAL4404, pSB1). pAL4404 é um plasmídio auxiliador desarmado (Ooms et al., 7:15-29, 1982). pSB1 é um plasmídio de ampla gama de hospedeiros contendo uma região de homologia com pGIGUP e um fragmento KpnI de 15,2 kb da região de virulência do pTiBo542 (Ishida et al., *Nature Biotechnology* 14:745-750, 1996). A introdução do plasmídio pGIGUP por eletroporação em LBA4404 (pAL4404, pSB1) resultou em uma co-integração de pGIGUP e pSB1. O pGIGUP contém um gene de fosfinotricina acetil transferase (PAT) expressável, acionado pelo promotor da ubiquitina de milho, para conferir resistência a fosfinotricina (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 18:675-689, 1992). Também contém um gene para expressão de β -glicuronidase (GUS) com um íntron no códon N terminal da sequência de codificação acionada por um promotor quimérico derivado dos genes da octopina e manopina sintase (um trímero da sequência de ativação a montante do promotor da octopina sintase).

se com um domínio do promotor da manopina sintase, Ni et al., Plant J., 7:661-676, 1995). Esse gene íntron-GUS expressa atividade de GUS na célula vegetal, mas não em *Agrobacterium*. O *Agrobacterium* é cultivado durante 3 dias em meio YP (5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de ágar, pH 6,8) suplementado com 50 mg/l de espectinomicina e 10 mg/l de tetraciclina. As bactérias são coletadas com uma alça e postas em suspensão em meio líquido N6, a uma densidade que varia de 10^9 a 5×10^9 células/ml. *Agrobacterium* pode ser alternativamente coletado de uma cultura de uma noite em meio YP e ressuscitado em meio líquido N6. Também pode ser pré-induzido durante 4 a 6 h em Meio de Indução de *Agrobacterium* (AIM; K_2HPO_4 , 10,5 g; KH_2PO_4 , 4,5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g; Citrato de Na_2H_2O , 0,5 g; $MgSO_4 \cdot H_2O$ (1 M), 1,0 ml; Glicose, 2,0 g; Glicerol, 5,0 ml; MÊS (10 mM); Acetossiringona (50 – 100 μ M); pH 5,6).

Tratamento de tecidos com choque térmico:

Antes do co-cultivo, os tecidos de milho são colocados em um tubo Eppendorf em meio líquido N6 e incubados durante 4 min a 45°C em um banho de água. O meio é, então, substituído por uma suspensão de *Agrobacterium* preparada conforme acima descrito. Após 5 min à temperatura ambiente, os tecidos são plaqueados em meio sólido apropriado. 3 dias após a co-inoculação, os tecidos são tingidos com X-Glu para se detectar atividade de GUS ou plaqueados em meio com cefotaxima (250 mg/l). Os tecidos de milho são, então, examinados para se detectar a resposta de calo, que indica a porcentagem de tecidos que sobrevivem à inoculação com *Agrobacterium*.

Co-cultivo:

Tecidos de milho preparados conforme acima descrito são inoculados com *Agrobacterium*. São embebidos na suspensão bacteriana durante 5 – 10 min e, então, plaqueados em meio sólido. Após a inoculação, os tecidos de milho foram cultivados no escuro a 25°C. 2 ou 3 dias após a inoculação, os tecidos são transferidos para o mesmo meio suplementado com cefotaxima (250 mg/l).

Deteção in situ da fragmentação de DNA:

Os embriões são embebidos em uma solução de formaldeído a 3,7% e processados conforme descrito pelo fabricante (Trevigen). Para se detectar clivagem de DNA genômico in situ, embriões fixados são tratados com o kit TACS-1 (Cullivier et al., Nature 381: 800-803, 1996). Seções transversais fixadas são primeiro tratadas com proteínas K durante 5 min à temperatura ambiente e, então, mergulhadas durante 5 min em peróxido de hidrogênio a 2% para remover a peroxidase endógena. Após uma breve lavagem com tampão de Klenow, os tecidos são incubados durante 1 h a 37°C com a enzima Klenow, que pode incorporar desoxinucleotídeos modificados exógenos nas terminações 5' dos fragmentos clivados. Um precipitado insolúvel escuro, indicativo de apoptose, que aparece na célula individual é detectável com um microscópio.

Resultados:

- Um fenômeno de grande coloração marrom foi observado após o co-cultivo de *Agrobacterium* e tecidos de milho, e uma concentração de 10^9 células/ml podia induzir a morte celular. Os embriões pareceram ser mais sensíveis a *Agrobacterium* do que calos embriogênicos.

- Embriões e calos do tipo I são submetidos a um choque térmico e, então, inoculados com *Agrobacterium* a uma concentração de 10^9 células/ml. Após três dias de co-cultivo e cultura durante uma semana, os tecidos são examinados. O nível de proteção conferido pelo pré-tratamento com choque térmico é quantificado contando-se o número de tecidos que sobrevivem a inoculação.

Todos os embriões inoculados com *Agrobacterium* após um pré-tratamento com choque térmico mostram iniciação de calo, ao passo que nenhum calo surge em embriões que não sejam submetidos a um choque térmico (Tabela 4).

Tabela 4:

Os embriões são inoculados com 10^9 células/ml de *Agrobacterium* LBA4404 (pGIGUP) e, então, plaqueados em meio de iniciação de calo. O meio básico é 2DG4+5Chl (2DG4). Todos os tratamentos são feitos com cerca de 80 a 100 embriões e repetidos duas vezes. A iniciação do calo é

avaliada duas semanas após a inoculação.

Pré-tratamento	Embriões com resposta de calo / Embriões inoculados
Controle	137/150 (91 %)
Sem choque térmico + Agro	3/150 (2%)
Choque térmico + Agro	112/150 (75%)

O mesmo efeito benéfico do tratamento com choque térmico é observado para o calo (Tabela 5).

Tabela 5:

- 5 Calo do tipo I é inoculado com 10^9 células/ml de *Agrobacterium* LBA4404 (pGIGUP). O meio básico usado é 2DG4 + 0,5 de 2,4D (2DG4). Todos os experimentos são efetuados em aproximadamente 1.000 pedaços de calo do tipo I. A sobrevivência dos tecidos é avaliada 2 semanas após a inoculação.

Pré-tratamento	Contagem de sobreviventes
linhagem de calo do tipo I de 3 meses de idade	
<i>Agrobacterium</i>	0/1000
Agro + Choque térmico	≈ 1000/1000
Linhagem de calo do Tipo I de 10 meses de idade	
<i>Agrobacterium</i>	0/1000
Pré-tratamento	Contagem de sobreviventes
Agro + Choque térmico	≈ 1000/1000

- 10 A proteção observada após o pré-tratamento com choque térmico parece estar associada ao choque térmico, porque importantes proteínas de choque térmico podem ser amplificadas por RT-PCR.

- Nenhuma fragmentação de DNA é detectada em embriões submetidos a um pré-tratamento de choque térmico.

- 15 - Embriões de várias linhagens de milho são inoculados com *Agrobacterium* cepa LBA4404 (GIGUP) induzido em solução de AIM, com ou sem um pré-tratamento de choque térmico. Após três dias de co-cultivo, os

embriões são tingidos para atividade de GUS. Os resultados são apresentados na Tabela 6. Parece que um pré-tratamento de choque térmico tem um efeito benéfico na expressão transitória.

Tabela 6:

Pedigree	Tratamento	GUS pos. % do total*	Classificação de GUS**
0F502	-	15	0,3
	HS	74	1,8
FNU007	-	90	2,0
	HS	96	3,4
HAF031	-	0	0,0
	HS	67	0,9
2N217A	-	13	0,1
	HS	46	0,4
1NJ20	-	5	0,1
	HS	38	0,4
JEF091	-	59	1,2
	HS	81	1,4

5 - : Sem choque térmico.

HS: choque térmico.

*As porcentagens de GUS se baseiam em um tamanho de amostra de aproximadamente 50 embriões imaturos.

10 **A classificação de GUS se baseia em uma escala de 0 – 5 (0 = nenhuma coloração para GUS, 1 = 1 – 5 pontos/embrião, 2 = 5 – 15 pontos, 3 = 15 – 30 pontos, 4 = ~25% da superfície do embrião com coloração para GUS, e 5 = ~50% da superfície do embrião com coloração para GUS.

Exemplo 7: Transformação com *Agrobacterium* de trigo

15 Embriões zigóticos imaturos (0,75 mm a 1,25 mm) são excisados e plaqueados em meio à base de MS com 3 mg/l de 2,4-D, 300 mg/l de glutamina, 150 mg/l de asparagina e 3% de sacarose (3MS3S) durante 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 21 dias antes da inoculação com *Agrobacterium*. Em 21 dias,

os explantes produzem uma massa embriogênica chamada de calo de 3 semanas.

Co-cultivo:

5 Tecidos de trigo são inoculados com as *Agrobacteria* descritas no Exemplo 6. Tecidos de trigo são embebidos na suspensão *bacteriana* durante 5 – 10 min e, então, plaqueadas em meio sólido. Após a inoculação, os tecidos de trigo são cultivados no escuro a 25°C. 2 ou 3 dias após a inoculação, os tecidos são transferidos para o mesmo meio suplementado com cefotaxima (250 mg/l). Os explantes são inoculados sem receberem um pré-
10 tratamento, ou são submetidos a um choque térmico a 42 – 48°C durante 4 – 8 minutos. O tratamento com choque térmico é efetuado antes da inoculação. Os embriões podem ser submetidos ao choque térmico em 3MS inf ou AIM com 100 mM de líquido AS, ao passo que os calos são submetidos ao choque térmico "secos".

15 Inoculação:

Os explantes são inoculados em tubos eppendorf ou em placas. Quando inoculados em tubos, 1 ml da solução de *Agrobacterium* é pipetada no tubo, girada ou agitada na mão e deixada em repouso durante 5 – 15 minutos. A solução de *Agrobacterium* e o material de explante são, então, ver-
20 tidos em uma placa de 3MS3S com 100 mM de AS, e o líquido é removido com uma pipeta de transferência de ponta estreita descartável. Quando a inoculação é feita em placas, o *Agrobacterium* é pipetado diretamente sobre os explantes e removido 5 – 15 minutos mais tarde. Os embriões são dispostos de modo que os eixos embriônicos estejam em contato com o meio.

25 Iniciação, seleção e regeneração do calo:

Os embriões são cultivados em meio de indução de calo (3MS3S) com antibiótico durante 3 semanas. Os calos embriogênicos são dissecados e colocados em MS3S (sem 2,4-D) com 5 mg/l de GA₃ e 1 mg/l de NAA com o agente de seleção e antibiótico durante 2 semanas, então,
30 removidos para MS3S com antibiótico e uma concentração mais elevada de agente de seleção durante aproximadamente 4 semanas. As mudas são, então, transferidas para caixas Magenta com ½ de sais MS e 0,5 mg/l de

NAA, enquanto se mantém a concentração do agente de seleção igual à da última etapa. Para calos, o sistema de seleção e regeneração é o mesmo, exceto que os calos são cultivados apenas durante um máximo de 6 semanas a partir do plaqueamento do embrião, isto é, calos de 3 semanas são inoculados, co-cultivados e cultivados durante um máximo de mais 3 semanas antes de se iniciar a seleção e regeneração.

Resultados:

- A fragmentação de DNA é estudada em embriões inoculados com *Agrobacterium* conforme descrito no Exemplo 6. Nenhuma fragmentação de DNA é detectada em embriões submetidos a um pré-tratamento de choque térmico.

- O pré-tratamento com choque térmico antes da inoculação com *Agrobacterium* pode prevenir o surgimento de apoptose.

Exemplo 8: Supressão de apoptose induzida por *Agrobacterium* em células de milho por p35 e iap

Vetores para transformação biolística:

Os vetores usados para transformar milho pelo dispositivo biolístico são todos derivados de pUC. pUbiPAT contém um gene *bar* expressável em plantas que codificam a fosfinotricina acetil transferase (PAT) acionada pelo promotor da ubiquitina do milho (Christensen et al., 1992), para conferir resistência à fosfinotricina (PPT). A região codificadora de p35, iap e dad-1 são clonadas sob o controle do promotor do gene do tipo metalotioneína do milho (MTL) (de Framond, 1991). p35 e iap são fornecidos por Lois Miller (Universidade da Geórgia, Atenas, Geórgia). O fragmento PstI-EcoRI de p35 que engloba a região codificadora é cortado de pHSP35VI⁺ (Clem e Miller, 1994), clonado nos sítios correspondentes de pBluescript (Stratagene, La Jolla, Califórnia) e, então, clonado como um fragmento PstI-Asp718 nos sítios correspondentes de pMTL. pMTL contém o promotor de MTL e o terminador de CaMV35S. O fragmento Sall-SpeI que engloba a região codificadora de iap de pHSCpIAPVI⁺ (Clem e Miller, 1994) é clonado em sítios XhoI-SpeI de pMTL. A sequência de codificação de dad-1 foi clonada como um Sall-XbaI do cDNA de Arabidopsis cone 12T7 (Universidade de Michigan).

Vetores para a transformação de *Agrobacterium*:

As regiões codificadoras de p35, iap e dad-1 acionadas pelo promotor de MTL são clonadas entre as seqüências de borda no vetor superbinário pSB11.

- 5 O gene da β -glicuronidase (GUS) com um íntron no códon N terminal da seqüência de codificação é acionado por um promotor quimérico derivado dos genes da octopina e manopina sintase (mas; trímico da seqüência de ativação a montante do promotor da octopina sintase com um domínio do promotor da manopina sintase; Ni et al., 1995). Mas-GUS que
10 expressa atividade de GUS na célula vegetal, mas não em *Agrobacterium*, é clonado em pSB11 para fornecer pMasGUS.

- Esses vetores são, então, introduzidos em LBA4404 (pAL4404, pSB1) por eletroporação com cubetas Bio-Rad de 0,2 cm a uma intensidade de campo de 2 kV/cm, resistores de 600 Ohms e uma capacitância de 25 μ
15 F. pSB1 é um plasmídio de ampla faixa de hospedeiros que contém uma região de homologia com pSB11 e um fragmento KpnI de 15,2 kb da região de virulência de pTiBo542 (Ishida et al., 1996). A introdução do plasmídio pSB11 por eletroporação em LBA4404 (pAL4404, pSB1) resulta em uma co-integração de pSB11 e pSB1.

20 Inoculação de embriões de milho com *Agrobacterium*:

- Embriões imaturos (0,8 a 2,5 mm) são assepticamente excisados 12 a 15 dias após a polinização e plaqueados com o escutelo para cima em meio de iniciação de calo (2DG4 + 5 Clloramben; Duncan et al., 1985). Os embriões são inoculados com *Agrobacterium* a uma densidade de 10^9
25 células/ml durante 5 min e, então, cultivados no meio de iniciação de calo durante 3 dias. Os tecidos são, então, transferidos para o mesmo meio suplementado com cefotaxima (250 mg/l). A sobrevivência dos tecidos é avaliada 2 semanas após a inoculação.

Iniciação de calo do tipo I:

- 30 Embriões plaqueados em meio de iniciação de calo durante 7 a 20 dias dão origem a calos. Esses calos são calos do tipo I típicos, que são aglomerados compactos de células relativamente bem organizadas (Suttie et

al., 1994). O calo embriogênico resultante é cortado dos embriões e transferido para meio de manutenção de calo, 2DG4 + 0,5 mg/l de ácido (2,4-diclorofenóxi) acético (2,4-D). Calos do tipo I obtidos pelo método acima descrito podem ser mantidos no meio de manutenção (2DG4 + 2,4 D a 0,5 mg/l) e subcultivados a cada 2 semanas aproximadamente. O calo do tipo I é usado para experimentos de inoculação com *Agrobacterium* e para transformação pelo dispositivo biolístico.

Experimentos de transformação:

O DNA de plasmídio é precipitado em um microveículo de ouro de 0,3 a 1 μm , conforme descrito no manual Biolistic da DuPont. 2 μg do gene antiapoptótico e 2 μg de pUbiPAT são usados por 50 μl de microveículo. 16 pedaços de calo do tipo I por placa são bombardeados usando-se o dispositivo biolístico PDS-1000/He (DuPont). Os tecidos são colocados na prateleira 8 cm abaixo da prateleira de tela de parada, e uma tela de aço inoxidável de 10 x 10 μm é usada com discos de ruptura com um valor de 47 kg/cm^2 (650 psi). Após o bombardeamento, os tecidos são cultivados no escuro durante um dia a 25°C, então, transferidos para meio de manutenção de calo 2DG4 + 0,5 mg/l de 2,4-D. 10 dias mais tarde, os tecidos são transferidos para o mesmo meio suplementado com 100 mg/l de PPT. Seis a oito semanas mais tarde, os tecidos são transferidos para 40 mg/l de PPT. Alguns dos tecidos são, então, usados para experimentos de inoculação, e parte deles é transferida para meio de regeneração (Murashige e Skoog contendo 3% de sacarose, 0,25 mg/l de ancimitol e 5 mg/l de cinetina) com 16 horas de luz por dia. As plantas transformadas são identificadas usando-se o ensaio de vermelho clorofenol (CR) para testar a resistência a PPT (Cramer et al., 1993) e, então, confirmada por PCR.

Inoculação de calo do tipo I transgênico com *Agrobacterium*:

Tecidos do tipo I transgênicos, obtidos conforme acima descrito, são inoculados com *Agrobacterium*. Tecidos de milho são embebidos na suspensão bacteriana durante 5 – 10 min. Após a inoculação, os tecidos de milho são cultivados no escuro a 25°C em 2DG4 + 0,5 mg/l de 2,4-D. Dois ou três dias após a inoculação, os tecidos são transferidos para o mesmo

meio suplementado com cefotaxima (250 mg/l).

Análise do material transgênico:

DNA genômico é extraído de 100 mg de calo com o kit Isoquick (Microprobe, CA) e ressuspendido em 20 µl de água. 1 µl é usado para a
 5 reação de PCR. As reações de PCR são efetuadas em cicladores térmicos Perkin-Elmer em 25 µl de reação usando 1 x tampão de PCR, 0,5 unidades de AmpliTaq, 200 µM cada de dNTPs, 0,2 µM de cada primer. Para se detectar a presença do gene pat nos tecidos, as reações de PCR são efetuadas com os primers PAT a uma temperatura de recombinação de 55°C. Para
 10 a detecção dos genes iap, p35 e dad-1 em tecidos transgênicos, os primers usados para cada reação são P e I, P e 35 e P e D, a uma temperatura de recombinação de 55°C, 55°C e 48°C, respectivamente.

PAT1: 5'-TGTCTCCGGAGAGGAGACC-3' (SEQ ID NO: 1)

PAT2: 5'-CCAACATCATGCCATCCACC-3' (SEQ ID NO: 2)

15 MTL(P): 5'-AGGTGTCCATGGTGCTCAAG-3' (SEQ ID NO: 3)

iap(I): 5'-ACAATCGAACCGCACACGTC-3' (SEQ ID NO: 4)

p35(35): 5'-CCAGGTAGCAGTCGTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 5)

dad-1 (D): 5'-CCTTGTTTCCTTTGTTCACT-3' (SEQ ID NO: 6)

RT-PCR com p35 e iap:

20 O RNA total é extraído de calos transgênicos usando Reagente de Isolamento Tripuro (Boehringer Mannheim), tratado com DNase livre de RNase, e 0,5 µg são colhidos para síntese de cDNA usando vantajosamente RT-PCR (Clontech) e primer oligo-dT. Após a síntese do segundo filamento, um vigésimo dessa reação é usado como molde para a reação de PCR com
 25 Taq DNA polimerase.

Os primers p35 usados para RT-PCR são:

5'-GGTCCTATACGAAGCGTTAC-3' (SEQ ID NO: 7) e 5'-CCACGTAGCAGTCGTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 8), amplificando 300 pb de transcrito.

30 Os primers iap para RT-PCR são:

5'-CATGTCTGACTTGCGATTGG-3' (SEQ ID NO: 9) e 5'-ACAATCGAACCGCACACGTC-3' (SEQ ID NO: 10), amplificando 248 pb de

transcrito.

Para excluir a contaminação de DNA genômico, reações de cDNA de controle, em que a transcriptase reversa é omitida, são preparadas em paralelo.

5 Resultados:

- A maioria dos embriões e calos embriogênicos não sobrevivem à inoculação com *Agrobacterium*. Uma curta exposição (5 min) é suficiente para induzir essa reação. Tecidos que são co-cultivados com *Escherichia coli* e submetidos aos mesmos procedimentos não exibem nenhuma lesão.
- p35, iap e dad-1 foram clonados no cassete de expressão em plantas entre as seqüências de borda do T-DNA. Como esses genes antiapoptóticos são trazidos pelo T-DNA, devem ser distribuídos às células de milho no momento da inoculação. Os tecidos de milho são inoculados com *Agrobacterium* LBA4404 (10^9 células/ml), com ou sem os genes supressores de morte celular (entre colchetes). Após o co-cultivo, embriões de milho ou calos do tipo I são examinados para se quantificar a sobrevivência do tecido como uma indicação do nível de proteção conferido pela expressão dos genes antiapoptóticos. Todos os tratamentos são feitos com cerca de 50 a 80 explantes de milho e repetidos duas vezes. Os tecidos são transferidos 3 dias após a inoculação para o mesmo meio contendo cefotaxima. O efeito do *Agrobacterium* é avaliado duas semanas após a inoculação. Os resultados são apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 (embriões)

	Nº de tecidos com resposta/Nº de tecidos testados (%)	
	Experimento nº 1	Experimento nº 2
Sem bactéria	52/63 (82%)	25/31 (80%)
LBA4404	2/55 (3%)	3/89 (3%)
LBA4404 (p35)	19/75 (25%)	18/74 (24%)
LBA4404 (iap)	22/89 (24%)	21/75 (28%)
LBA4404 (dad-1)	4/48 (8%)	10/66 (15%)

Tabela 8 (Calo do tipo I)

	Nº de tecidos com resposta/Nº de tecidos testados (%)	
	Experimento nº 1	Experimento nº 2
Sem bactéria	76/80 (95%)	72/80 (90%)
LBA4404	8/80 (10%)	6/80 (7,5%)
LBA4404 (p35)	23/80 (29%)	27/80 (33%)
LBA4404 (iap)	25/80 (31%)	30/80 (37%)
LBA4404 (dad1)	15/80 (18%)	13/80 (16%)

Cerca de 80% dos embriões dão origem a calos embriogênicos quando não são tratados com *Agrobacterium*. Cerca de 25% dos embriões tratados com *Agrobacterium* portador de p35 ou ipa dão origem a calos embriogênicos, ao passo que apenas 3% dos embriões inoculados com *Agrobacterium* exibiram iniciação de calo. Um efeito similar é observado com calos do Tipo I inoculados com *Agrobacterium* portando p35 ou iap (Tabela 2). dad-1 conferiu apenas baixos níveis de proteção em qualquer sistema.

- Parece que a expressão transitória de p35 e iap reduz a coloração marrom de tecidos em alguma medida, mas não inibe completamente o fenômeno. Isso pode ser explicado por uma baixa eficiência da transferência de T-DNA para as células de milho. Conforme julgado pela expressão transitória com GUS, parece que o tecido alvo não é uniformemente transformado. Isso pode ser uma indicação de que muito poucas células são receptoras de T-DNA.

- A estrutura do calo embriogênico que emerge dos embriões inoculados com *Agrobacterium* contendo p35 ou iap não é tão compacta quanto a do controle. Isso pode ser explicado pelo fato de que apenas células que recebem o T-DNA portador do gene antiapoptótico sobrevivem e de que células transformadas individuais não transmitem necessariamente o sinal para células vizinhas. Esse tipo de crescimento de tecido pode ser evidência de que os genes supressores de morte celular salvam células condenadas muito eficazmente, mas sua expressão de curto prazo não confere proteção total contra o efeito de *Agrobacterium*.

- Calos embriogênicos transgênicos para p35, iap e dad-1 resul-

5 tam da distribuição dos ditos genes sob o controle de um promotor expressável em plantas no calo do Tipo I com bombardeamento de microprojéteis. Os construtos são co-bombardeados com o gene bar, os tecidos são selecionados em PPT e o estado transformado desses calos é primeiro confirmado por PCR (Tabela 9).

Tabela 9

Experimento de transformação	#PCR +
UbiPAT	5 PAT +
MTLp35, UbiPAT	9 PAT +, 3 p35 +
MTLiap, UbiPAT	7 PAT +, 5 iap +
MTLdad, UbiPAT	11 PAT +, 4 dad-1 +

10 A sensibilidade à inoculação com *Agrobacterium* é, então, ensaiada em eventos independentes. O calo é inoculado com *Agrobacterium* LBA4404 (10^9 células/ml). Duas linhagens de calos transgênicos independentes são testadas. Todos os tratamentos são repetidos duas vezes. Os tecidos são transferidos 3 dias após a inoculação para o mesmo meio contendo cefotaxima. A sobrevivência de tecidos de milho é avaliada duas semanas após a inoculação com *Agrobacterium* (Tabela 10).

Tabela 10

Experimento de transformação	Número de calos resistentes a LBA4404	
	Linhagem 1	Linhagem 2
UbiPAT	1/24 (4%)	1/32 (3%)
MTLp35, UbiPAT	22/25 (88%)	25/28 (89%)
MTLiap, UbiPAT	20/22 (90%)	19/25 (76%)
MTLdad, UbiPAT	12/27 (44%)	9/22 (41%)

15 Calos embriogênicos transgênicos para p35 e iap não exibem morte celular quando submetidos à inoculação com *Agrobacterium*, ao passo que se observa uma grande coloração marrom em tecidos de controle após o co-cultivo. A presença do gene dad-1 retarda o surgimento de apoptose, mas não bloqueia a morte celular como iap e p35 o fazem. Os resultados
20 são reprodutíveis em vários experimentos independentes.

- O efeito protetor de p35 e iap também é evidente quando me-

dido por eletroforese de fragmento de DNA oligonucleossômico.

- Parece que o efeito do dad-1 é mais óbvio quando expressado de maneira estável nos tecidos.

- Há uma clara correlação entre a expressão dos genes antiapoptóticos e a ausência de morte celular. Os genes p35 e iap são expressados em calos transgênicos, conforme julgado por PCR de transcrição reversa (RT-PCR). Os controles foram uniformemente negativos.

Exemplo 9: Triagem e identificação de cepas de *Agrobacterium* que não induzem morte celular em células de milho

A sensibilidade de calos embriogênicos e embriões de uma linhagem de milho bem estudada (A188) e de uma linhagem de elite registrada (Elite 2) a várias cepas de *Agrobacterium* é testada usando-se um painel de 40 cepas de *Agrobacterium* do tipo selvagem. Essas cepas são primeiro testadas quanto à sua compatibilidade com calos embriogênicos e embriões A188 e Elite 2. Dentre essas, 6 das 40 cepas não impedem inteiramente o crescimento de tecidos de milho e são adicionalmente testadas em embriões de Elite 2 plaqueados em meio de iniciação de calo e inoculados a uma concentração de 10^9 células/ml. A iniciação do calo é avaliada 2 semanas após a inoculação e expressada como uma porcentagem de embriões com resposta.

Essas cepas também são testadas quanto à sua virulência em discos de folha de tabaco plaqueados em meio livre de hormônio, e se nota que o potencial das cepas de induzirem morte celular programada em células de milho não se correlaciona com a virulência. A porcentagem na Tabela 11 descreve o número de discos de folha com tumores.

Tabela 11: Comparação da virulência de cepas não necrogênicas

Cepas	Fonte	Opina	Virulência testada em tabaco (%)	2dg4+5Chl (%)
1	rosa	?	100	37
2	pêssego	nopalina	82	25
3	choupo	agropina	66	50
4	crisântemo	L,L Sap	100	63

A	rosa	nopalina	92	66**
B	salix	nopalina	76	58**

** Calo do tipo I bom.

As cepas A e B de *Agrobacterium* foram depositadas na ATCC em 2 de maio de 1997, de acordo com o Tratado de Budapeste, sob os números de designação ATCC 55964 e 55965, respectivamente.

5 Exemplo 10: Genes de *Agrobacterium* que desencadeiam apoptose em células de milho

Uma biblioteca BAC (cromossomo artificial bacteriano) é construída com fragmentos de DNA genômico de *Agrobacterium* de aproximadamente 100 – 200 kb, em um esforço para identificar elementos genéticos responsáveis pela resposta de morte celular em tecidos embriogênicos de milho. A biblioteca é introduzida em *Escherichia coli*. Para se verificar se essa base é adequada para a triagem da biblioteca BAC, *E. coli* contendo apenas vetor BIBAC é inoculada em embriões de milho. Verificou-se que *E. coli* não induz uma resposta apoptótica característica.

15 Estima-se que cerca de 25 a 30 clones BAC com enxertos de 150 – 200 kb são suficientes para cobrir todo o genoma de *Agrobacterium*, considerando-se que o *Agrobacterium* tenha um tamanho de genoma razoavelmente equivalente ao da *E. coli* ($4,6 \times 10^6$ pb). Um número relativamente grande de clones (200) é hibridizado com uma sonda cromossômica de *Agrobacterium* (chvD) para testar se a biblioteca BAC preparada em *E. coli* é uma representação clara do genoma de *Agrobacterium*. Dentre os 200 clones testados, 5 se iluminaram com a sonda chvD (dados não mostrados).

25 Um desafio é que os componentes genéticos de *Agrobacterium* poderiam estar silenciosos em *E. coli*. Além disso, fatores adicionais das plantas e/ou do *Agrobacterium* poderiam ser necessários para a expressão desse cone. Conseqüentemente, o vetor BAC também contém uma origem de replicação funcional em *Agrobacterium* e pode ser prontamente transformado em *Agrobacterium* nesse cenário.

Crescimento bacteriano:

30 *Agrobacterium* é cultivado durante 3 dias em meio YP (5 g/l de

extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de ágar, pH 6,8) suplementado com 100 mg/l de canamicina quando necessário. As bactérias são coletadas com uma alça e posta em suspensão em meio líquido N6, a uma densidade que varia de 10^9 a 5×10^9 células/ml. As células de *Agrobacterium* também podem ser coletadas de uma cultura de uma noite em meio YP e ressuspensas em meio líquido N6.

E. coli DH10B é cultivada em meio LB (1% de bacto-triptona, 0,5% de bacto-extrato de levedura, 170 mM de NaCl, pH 7,0). Após a transformação, é cultivada em solução SOC (2% de bacto triptona, 0,5% de bacto extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$, 20 mM de glicose, pH 7,0).

Preparação de DNA genômico de *Agrobacterium*:

A cepa LBA4404 é usada para a construção da biblioteca. O protocolo, os materiais e os reagentes usados são do kit Imbed (Biolabs, USA). 4 x 10 ml de culturas de *Agrobacterium* são cultivadas durante uma noite a 28°C. Uma hora antes da colheita, 180 mg/ml de cloranfenicol são adicionados para alinhar os cromossomos. As células são centrifugadas a 800 g a 4°C durante 15 min, e o pellet é seco ao ar. As células são preaquecidas em 0,5 ml de solução de suspensão celular (10 mM de Tris-HCl, 20 mM de NaCl, 100 mM de EDTA, pH 7,2) a 42°C antes de serem incrustadas em agarose. As células de *Agrobacterium* são incrustadas em bastões de agarose para realizar a degradação da parede celular e desproteinização, evitando o cisalhamento do DNA. Para incrustar as células em bastões de agarose, as células são misturadas com um volume igual de agarose de baixo ponto de fusão a 1% em ddH₂O resfriada a 42°C e, então, deixadas endurecer em um molde Gel Syringe. Com a solidificação da agarose, os tampões são transferidos para 3 volumes de solução de lisozima (1 mg/ml de lisozima, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 100 mM de EDTA, 0,2% de desoxicolato de sódio, 0,5% de N-laurilsarcosina, pH 7,2) e incubados durante 2 horas a 37°C com agitação suave. A solução de lisozima é removida, e os bastões são lavados duas vezes com 3 ml de solução de lavagem durante 15 min de cada vez. Os bastões são, então, incubados em 3 ml de solução de Proteinase K (1

mg/ml de proteinase K, 100 mM de EDTA, 1% de N-laurilsarcosina, 0,2% de desoxicolato de sódio, pH 8,0), durante 20 horas a 42°C com agitação suave. A solução de Proteinase K é removida por aspiração, e os bastões são dialisados duas vezes contra 5 ml de solução de lavagem (20 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, pH 8,0) durante 15 min, então, com 3 ml de solução PMSF (20 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 1 mM de fluoreto de fenil metil sulfonila, pH 8,0) durante uma hora, seguido por duas lavagens com solução de lavagem. Os bastões são, então, lavados duas vezes com 5 ml de solução de armazenamento (2 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, pH 8,0) durante 15 min e, então, são recarregados em GelSyringes. Amostras com 1 mm de comprimento (10 – 20 ml) são cortadas com uma lâmina de barbear e dialisadas contra tampão de endonuclease de restrição NotI (Biolabs, USA) durante 30 min a 4°C. O tampão de endonuclease de restrição é substituído por tampão fresco e a incubação é efetuada durante uma noite a 37°C com 20 unidades de enzima NotI (Biolabs, USA). A digestão parcial do DNA de *Agrobacterium* é conseguida usando-se NotI, uma enzima de corte rara. NotI gera, teoricamente, fragmentos de 18 kb de comprimento após uma digestão total, considerando-se que o genoma de *Agrobacterium* tenha um teor de G/C de 60% (resultados extrapolados de diferentes genes de *Agrobacterium*). As alíquotas são, então, carregadas com uma pipeta cuja ponta é cortada. O DNA é separado por eletroforese em gel com campo de pulso (PFG) em um gel de agarose a 1%, em 0,5 x TBE a 14°C, usando um Mapeador CHEF Bio-Rad a 6 V/cm durante 32 h. O gel é tingido durante 20 min em um banho de EtBr ddH₂O a 1 mg/ml, e fatias de agarose contendo fragmentos correspondentes a 100 – 200 kb são excisadas do gel. As fatias de agarose são dialisadas duas vezes contra TE durante uma hora a 4°C e duas vezes com tampão de agarase (Biolabs, USA) durante uma hora a 4°C, derretidas a 65°C durante 10 min e digeridas com uma unidade de agarase (Biolabs, USA) por 100 mg de agarose. A concentração de DNA é estimada fluorometricamente usando um DyNA Quant 200 (Hoefer, USA).

Preparação do vetor BIBAC:

O vetor BIBAC foi gentilmente fornecido pela Dra. Carol M. Ha-

milton (Universidade de Cornell, Ithaca) (Hamilton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93, 9975-9979, 1996). O BIBAC é projetado para se replicar tanto em *E. coli*, quanto em *Agrobacterium* e também contém o gene *sacBII*, permitindo uma seleção direta de enxertos clonados em um meio de sacarose.

- 5 O vetor BIBAC também porta a origem de episomo de fator F, que permite uma manutenção estável de uma ou duas cópias por célula com enxertos de até 300 kb (Shizuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89, 8794-8797, 1992). O plasmídio é isolado usando-se o kit Wizard® Plus Maxiprep (Promega, USA). Efetua-se uma extração com fenol-clorofórmio antes da precipitação com isopropanol. O plasmídio é digerido com NotI e desfosforilado com 1 unidade de fosfatase alcalina de camarão (Boehringer Mannheim) a 37°C durante uma hora. A ligação é realizada em 40 µl, nos quais 150 ng de DNA de *Agrobacterium* são incubados com 17 ng de vetor cortado (razão molar estimada de 10:1 com excesso de vetor) com 400 unidades de T4 DNA ligase (Boehringer) a 17°C durante uma noite. Antes da transformação, a ligação é dialisada contra TE e 1/10 de TE em bolsas Micro-Collodion (Sartorius, Alemanha), a 4°C durante 2 horas.

Transformação de DH10B com biblioteca pBAC

- A transformação de células de *E. coli* DH10B competentes (F⁻, rec A1; ElectroMax, Gibco-BRL, USA) é realizada por eletroporação em cubetas Gene Pulser pré-resfriadas (Bio-Rad, USA) com Gene Pulser® (Bio-Rad, USA), usando os seguintes ajustes: tensão de 2,5 kV, capacitância de 25 mF e resistência de 200 W. 25 µl de células competentes são misturadas com 1 µl de solução de ligação para cada eletroporação. Após a eletroporação, as células são transferidas para 0,5 ml de solução SOC e incubadas a 37°C em uma roda girando durante 45 min. Alíquotas de 150 µl das células são plaqueadas em meio LB contendo canamicina (40 mg/ml) e sacarose (5%).

- Isolamento de DNA de BAC e determinação do tamanho do enxerto de DNA dos clones BAC

Clones BAC são cultivados durante uma noite sob agitação contínua em 10 ml de LB com canamicina (50 mg/ml). O DNA é extraído de a-

cordo com o método de lise alcalina (Sambrook et al., 1989) com as seguintes modificações: RNase a 30 mg/ml é adicionada à solução de ressuspensão, e uma purificação com fenol-clorofórmio é efetuada antes da precipitação com isopropanol. O pellet de ácido nucléico é dissolvido em 50 ml de ddH₂O. O DNA é separado por eletroforese PFG em um gel de agarose a 1% em 0,5 x TBE a 14°C, usando-se um Mapeador CHEF Bio-Rad a 6 V/cm durante 32 h.

Inoculação de embriões de milho com *Agrobacterium*:

Embriões imaturos (0,8 a 2,5 mm) são assepticamente excisados de 12 a 15 dias após a polinização e plaqueados com o escutelo para cima em meio de iniciação de calo (2DG4 + 5 Cloramben) (meio de Duncan "D" com glicose: N6 principal, B5 menor, MS ferro, 20 g/l de sacarose, 5 mg/l de cloramben, 8 g/l de ágar purificado, adições de G4 e 10 mg/l de glicose, pH 5,8) (Duncan et al., 1985). Células bacterianas são ressuspensas em 2N63SM (3,97 g/l de sais de N6, vitaminas de N6, 30 g/l de sacarose, 2 mg/l de 2,4-D, 8 g/l de ágar purificado, pH 5,8). Os embriões são inoculados com *Agrobacterium* ou com *E. coli*, a uma densidade de 10⁹ células/ml, durante 5 min e, então, cultivados no meio de iniciação de calo durante 3 dias. Os tecidos são, então, transferidos para o mesmo meio suplementado com cefotaxima (250 mg/l). A sobrevivência dos tecidos é avaliada 2 semanas após a inoculação.

Transformação de *Agrobacterium*

A transformação de *Agrobacterium* é efetuada conforme anteriormente descrito (Wen-Jun e Forde, Nucleic Acids Research 20:8385, 1989) em uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad Laboratories Ltd., USA) usando um Gene Pulser[®] (Bio-Rad, USA), a uma intensidade de campo de 10 kV/cm (2,00 kV), uma capacitância de 25 mF e uma resistência de 600 Ω.

Vetores para transformação biolística:

Os vetores usados para transformar milho pelo dispositivo biolístico são todos derivados de pUC. pMTL é um vetor de transformação de plantas contendo o promotor do gene do tipo metalotioneína do milho (MT-L)

(de Framond, 1991). A região codificadora de virB1 é amplificada por reação em cadeia de polimerase com o clone BAC como molde e a partir da cepa A com os seguintes primers: 5'-GGAGAGGCGGTGTTAGTT-3' (SEQ ID NO: 11); 5'-CATCATCGCATTTCGAGAG-3' (SEQ ID NO: 12). As reações de PCR
 5 são efetuadas em cicladores térmicos Perkin-Elmer, uma reação de 25 µl com 1 x tampão de PCR, 0,5 unidades de AmpliTaq, 200 µM cada de dNTPs, 0,2 µM de cada primer, a uma temperatura de recombinação de 55°C. O produto de PCR é primeiro clonado no vetor pCR2.1 para clonagem de TA (Invitrogen, San Diego, USA). É, então, excisado por uma digestão
 10 dupla com XbaI-SpeI e, então, clonado no sítio XbaI do vetor pMTL em orientação de sentido e anti-sentido, dando origem a pMTL-virB1 e pMTL-virB1as, respectivamente. De maneira similar, o produto de PCR amplificado a partir da cepa A é clonado em pMTL em orientação de sentido e anti-sentido, dando origem a pMTL-virB1A e pMTL-virB1Aas, respectivamente.
 15 acvB é clonado no sítio XbaI-XhoI de pMTLsentido e pMTLanti-sentido, dando origem a pMTL-acvB e pMTL-acv-Bas.

pGUS contém o gene da β-glicuronidase (GUS) com um íntron no códon N terminal da sequência de codificação e é acionado por um promotor quimérico derivado dos genes da octopina e manopina sintase (um
 20 trímico da sequência de ativação a montante do promotor da octopina sintase com um domínio do promotor da manopina sintase) (Ni et al., 1995).

Células de milho em suspensão

Uma cultura em suspensão de *Zea Mays* cv Black Mexican Sweet (BMS) é mantida em meio N6 (Chu et al., 1975) e suplementada com
 25 30 g/l de sacarose e 2 mg/l de ácido 2,4-diclorofenóxi acético (2,4-D) (2N63S). As suspensões de células de milho usadas para experimentos de bombardeamento são tomadas de culturas de rápido crescimento com 3 dias de idade. Antes do bombardeamento, aproximadamente 0,5 ml de volume compactado de células é filtrado a vácuo em filtros de 7 cm (Whatman, nº 4).
 30 Células plaqueadas são mantidas 4 horas a 25°C em meio 2N6 solidificado com fitagar contendo 120 g/l de sacarose antes do bombardeamento.

Bombardeamento de células vegetais

Os tecidos são bombardeados com microprojéteis de ouro, sobre os quais uma mistura de plasmídios foi precipitada. O DNA de plasmídio pGUS é usado como um controle interno em estudos de expressão transitória. Para experimentos de co-transformação, as partículas de ouro trazem uma massa igual de todos os DNAs de plasmídio (0,5 µg de cada DNA de plasmídio por placa alvo). Quantidades apropriadas de cada DNA são misturadas em um volume total de 10 µl e precipitadas com 50 µl de CaCl₂ a 2,5 M e 20 µl de base livre de espermidina a 0,1 M sobre 50 µl de microveículos de ouro de 0,3 µm (60 mg/ml). O bombardeamento de microprojéteis é efetuado com o dispositivo biolístico PDS-1000 He (DuPont), usando discos de ruptura de 77 kg/cm² (1.100 psi), com a amostra posicionada 8 cm abaixo da prateleira de tela de parada.

Ensaio de expressão transitória

A atividade de β-glicuronidase é determinada por um ensaio quimioluminescente com o kit GUS-Light (Tropix). As atividades de β-glicuronidase são expressadas como unidades de luz detectadas por um Luminômetro Analítico de Luminescência modelo 2001 integrado durante 10 segundos a 25°C.

Hibridização de colônia

Clones BAC de um dia de idade são colocados sobre filtros de náilon (Hybond—N, Amersham Life Sciences, UK) para hibridização com sondas derivadas de *Agrobacterium* radioativamente marcadas. As sondas de DNA são marcadas com [α-³²P]dCTP usando o kit de marcação óligo da Pharmacia. A sonda chvG e a sonda virD1 correspondiam a um fragmento amplificado por PCR. Os filtros de biblioteca são pré-hibridizados em solução de hibridização a 65°C durante duas horas (5 x SSPE, 5 x solução de Denhardt, 0,5% de SDS, 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmão). A hibridização é efetuada no mesmo tampão a 65°C durante uma noite. Os filtros são enxaguados em 1 x SSC, 0,1% de SDS durante 15 min a 65°C, seguido por uma incubação em 0,1 x SSC, 0,1% de SDS durante 15 min a 65°C. Os filtros são brevemente secos com papel toalha, e a película é exposta durante uma noite a -70°C usando-se uma tela de intensificação.

Para a amplificação por PCR, um laço de LBA4404 é ressus-
pendido em ddH₂O, aquecido a 95°C durante 15 min, centrifugado, e 1 ml é
usado para a reação de PCR com as seguintes condições: 5 min a 95°C e,
então, 30 ciclos a 95°C durante 45 segundos, a 55°C durante 45 segundos e
5 a 72°C durante 45 segundos.

Resultados

- Aproximadamente 20 embriões de milho são inoculados com
um clone da biblioteca BAC e plaqueados em um meio de iniciação de calo.
Após o co-cultivo, os embriões são transferidos para o mesmo meio suple-
10 mentado com 250 mg/ml de cefotaxima. Os embriões são, então, examina-
dos para se avaliar a lesão causada pela bactéria recombinante. Dentre 160
clones triados, 4 clones BAC independentes são identificados (BAC1, BAC2,
BAC3, BAC4).

Para localizar ainda mais a região no clone BAC responsável
15 pela morte celular dos tecidos de milho, fragmentos HindIII de clones BAC
são subclonados em um vetor bluescript. Cada um desses clones é testado
em tecidos de milho para determinar quais retêm a capacidade de provocar
morte celular.

- As seqüências de DNA são determinadas usando-se subclones
20 e oligonucleotídeos. As seqüências de BAC1-2, BAC2-2 e BAC3-2 revelam
homologia com virB1, xylA-xylB e acvB, respectivamente. BAC-4 é idêntico a
BAC3-2.

- Clones BAC portadores de acvB (BAC3 e BAC4), virB1 (BAC1)
e xylA-xylB (BAC2) são introduzidos na cepa A, resultando nas cepas
25 A(acvB), A(virB1) e A(xylA). Essas cepas são usadas para inocular tecidos
de milho. Tecidos inoculados com LBA4404 apresentam um padrão de mor-
te celular típico, ao passo que a infecção com cepa A é incapaz de produzir
esses sintomas. A(acvB), A(virB1) e A(xylA) induzem morte celular em dife-
rentes níveis, com A(acvB) sendo a mais forte. A presença desses genes
30 converte, portanto, a interação da cepa A com o milho e torna os tecidos de
milho mais sensíveis à infecção (Tabela 12).

Tabela 12

Cepas	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Sem bactéria	19/22 (86%)	15/18 (83%)	16/18 (88%)
LBA4404	2/20 (10%)	1/17 (6%)	3/20 (15%)
E. coli	17/20 (85%)	16/19 (84%)	17/21 (81%)
Cepa A	19/20 (95%)	17/21 (81%)	17/20 (85%)
E. coli (BAC1)	5/20 (25%)	5/17 (30%)	4/18 (22%)
E. coli (BAC2)	10/19 (52%)	10/20 (50%)	9/19 (47%)
E. coli (BAC3)	3/18 (16%)	4/17 (24%)	3/20 (15%)
E. coli (BAC4)	4/19 (21%)	3/19 (16%)	2/21 (9%)
Cepa A (BAC1)	5/19 (26%)	6/17 (35%)	8/25 (32%)
Cepa A (BAC2)	9/22 (41%)	10/23 (43%)	8/19 (42%)
Cepa A (BAC3)	3/20 (15%)	2/18 (11%)	3/21 (14%)
Cepa A (BAC4)	2/20 (10%)	3/19 (16%)	4/20 (20%)

- Em análise Southern, DNA genômico digerido com HindIII de *Agrobacterium* cepas A136, LBA4404, LBA4402, A e B é sondado sob condições de rigor moderado, com o fragmento portador de xylA ou acvB.
- 5 Fragmentos homólogos a xylA estão presentes em todas as cepas testadas. Sequências que se hibridizam com acvB são encontradas em LBA4404, LBA4402 e A136, que induzem morte celular em células de milho. De interesse, acvB não está presente em *Agrobacterium* cepas A e B. acvB, portanto, está limitado em sua distribuição. Conforme anteriormente relatado, acvB
- 10 está presente em relativamente poucas cepas de *Agrobacterium* (Wirawan et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60:44-49, 1993). xylA e acvB não estão presentes no plasmídio Ti, porque estavam presentes na cepa LBA4402 curada de Ti.

- Para se determinar se a expressão de acvB e virB1 em células
- 15 de milho é letal, esses genes são clonados em um vetor de expressão de planta e co-transformados com o vetor pGUS que expressa B-glicuronidase (GUS). No caso do gene de teste ser letal, a atividade de GUS está reduzida ou eliminada (Mindrinos et al., 1994). A região codificadora dos dois genes é subclonada em orientação de sentido e anti-sentido em um vetor de expres-

- são em plantas contendo o promotor MTL e biolisticamente distribuída a células de milho, juntamente com o vetor pGUS. Após 30 h, a atividade de GUS é avaliada em células de milho. Os resultados são mostrados na Tabela 13. A atividade de GUS é reduzida cerca de duas vezes quando virB1 é co-bombardeado com pGUS. Células de milho co-bombardeadas com acvB e pGUS mostram consistentemente uma redução de 35 vezes na atividade de GUS. Isso indica que a expressão de acvB em altos níveis em células de milho é prejudicial.

Tabela 13

- Os construtos de plasmídios são distribuídos a células de milho pelo dispositivo biolístico. Após uma incubação de 30 h, os tecidos são homogeneizados e as atividades de GUS são determinadas. As atividades são expressadas como Unidades de Luz/mg de proteína. Bombardeamentos independentes são analisados, e os dados são apresentados como valores médios de cinco repetições $\pm$ DP.

Plasmídios + pGUS	Média $\pm$ DP (Unidades de luz / μ g de proteína)
pUC	2082 $\pm$ 199
pMTL-virB1	1014 $\pm$ 106
pMTL-virB1as	2543 $\pm$ 176
pMTL-virB1K6	1738 $\pm$ 330
pMTL-virB1K6as	2168 $\pm$ 282
pMTL-acvB	61 $\pm$ 19
pMTL-acvBas	2378 $\pm$ 292

LISTAGEM DA SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÕES GERAIS:

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: NOVARTIS AG
 (B) RUA: Schwarzwaldallee 215
 (C) CIDADE: Basiléia
 (E) PAÍS: Suíça

(F) CEP: 4058

(G) TELEFONE: +41 61 324 11 11

(H) TELEFAX: +41 61 322 75 32

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Métodos de Transformação de Plan-

5 tas

(iii) NÚMERO DE SEQÜÊNCIAS: 10

(iv) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Disco flexível

(B) COMPUTADOR: Compatível com IBM PC

10

(C) SISTEMA OPERACIONAL: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, Versão 1.25 (E-

PO)

(2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:

15

(A) COMPRIMENTO: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) FILAMENTO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

20

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vii) FONTE IMEDIATA:

(B) CLONE: PAT1

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

25

TGTCTCCGGA GAGGAGACC

(2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

30

(C) FILAMENTO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vii) FONTE IMEDIATA:
- (B) CLONE: PAT2
- 5 (xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 2:
CCAACATCAT GCCATCCACC
- (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 3:
- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) FILAMENTO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- 15 (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vii) FONTE IMEDIATA:
- (B) CLONE: MTL (P)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 3:
AGGTGTCCAT GGTGCTCAAG
- 20 (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 4:
- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) FILAMENTO: simples
- 25 (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vii) FONTE IMEDIATA:
- 30 (B) CLONE: iap (I)
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 4:
ACAATCGAAC CGCACACGTC

(2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) FILAMENTO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vii) FONTE IMEDIATA:

(B) CLONE: p35 (35)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

CCAGGTAGCA GTCGTTGTGT

(2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) FILAMENTO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vii) FONTE IMEDIATA:

(B) CLONE: dad-1 (D)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

CCTTGTTTCC TTTGTTCACT

(2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) FILAMENTO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
(iii) HIPOTÉTICA: NÃO
(iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:
5 GGCCTATAC GAAGCGTTAC
- (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 8:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucléico
10 (C) FILAMENTO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
(iii) HIPOTÉTICA: NÃO
(iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
15 (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:
CCACGTAGCA GTCGTTGTGT
- (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 9:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
20 (B) TIPO: ácido nucléico
(C) FILAMENTO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
(iii) HIPOTÉTICA: NÃO
25 (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:
CATGTCTGAC TTGCGATTGG
- (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 10:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
30 (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucléico
(C) FILAMENTO: simples

- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
- 5 (xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 10:
ACAATCGAAC CGCACACGTC
- (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 11:
- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) FILAMENTO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- 15 (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 11:
GGAGAGGCGG TGT TAGTT
- (2) INFORMAÇÕES PARA SEQ ID NO: 12:
- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:
- 20 (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) FILAMENTO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)
- 25 (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iii) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQÜÊNCIA: SEQ ID NO: 12:
CATCATCGCA TTCGAGAG

REIVINDICAÇÕES

1. Método de transformação de uma célula vegetal com um gene de interesse, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) co-cultivo da dita célula vegetal com *Agrobacterium* sob condições que inibam a necrose induzida por *Agrobacterium* (AIN), em que o dito *Agrobacterium* compreende um vetor compreendendo o dito gene de interesse e em que as ditas condições compreendem o co-cultivo da dita célula vegetal com *Agrobacterium* na presença de um agente de inibição de necrose induzida por *Agrobacterium*; e

10 (b) seleção da célula assim transformada, sendo que o dito agente de inibição de necrose induzida por *Agrobacterium* é um inibidor químico que compreende um inibidor de etileno.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de etileno é selecionado do grupo consistindo em
15 2,5-norbornadieno, norborneno, tiosulfato de prata e nitrato de prata.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dita célula vegetal é uma célula de *Graminieae* sp.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita célula é uma célula de milho ou de trigo.

20 5. Método de preparação de uma planta transgênica fértil, caracterizado pelo fato de que compreende a transformação do tecido vegetal através do co-cultivo do dito tecido com *Agrobacterium* sob condições que inibam a AIN, e a regeneração do tecido assim transformado, em que o dito *Agrobacterium* compreende um vetor compreendendo um gene de interesse
25 e as ditas condições compreendem o co-cultivo da dita célula vegetal com *Agrobacterium* na presença de um agente de inibição de necrose induzida por *Agrobacterium*, em que o dito agente de inibição de necrose induzida por *Agrobacterium* é um inibidor químico que compreende um inibidor de etileno.

30 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de etileno é selecionado do grupo consistindo em 2,5-norbornadieno, norborneno, tiosulfato de prata e nitrato de prata.

RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA VEGETAL COM UM GENE DE INTERESSE E DE PREPARAÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA FÉRTIL**".

- 5 A presente invenção refere-se a um método aperfeiçoado de transformação de plantas com *Agrobacterium*, particularmente Gramineae, utilizando condições capazes de inibir a necrose induzida por *Agrobacterium* e a um método de preparação de uma planta transgênica fértil.