



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

(11) PI 0712484-8 B1

(22) Data do Depósito: 05/06/2007

(45) Data de Concessão: 06/06/2017



(54) Título: MÉTODO PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS

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

(30) Prioridade Unionista: 06/06/2006 US 60/811,190

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): YUECHUN WAN; RONALD J. BRINKER; PAUL C.C. FENG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Este pedido de patente reivindica a prioridade do Pedido de Patente Provisória Americana 60/811.190, depositada em 6 de junho de 2006, cuja descrição está por meio disso incorporada por referência na sua totalidade.

1. Campo da invenção

A presente invenção refere-se de forma geral ao campo de biotecnologia de plantas. Mais especificamente, a invenção refere-se a métodos para selecionar células de planta transformadas usando herbicidas similares à auxina como um agente seletivo.

2. Descrição da técnica relacionada

Cultivos transgênicos atualmente são cultivados em mais do que 80,0 milhões de hectares em todo o mundo. Características aperfeiçoadas fornecidas por transgenes aumentaram significativamente a produtividade, e em muitos casos diminuiu a dependência de herbicidas e inseticidas que podem potencialmente contaminar o ambiente. Entretanto, para os cultivos transgênicos continuarem a ser competitivos no mercado, novas características de valor agregado serão necessárias.

Na produção de plantas transgênicas, uma etapa particularmente importante é a seleção de células transgênicas. Isto é devido ao fato de que apenas uma pequena porcentagem de células é tipicamente transformada em qualquer protocolo de transformação. O uso de um gene marcador selecionável permite que estas células que contêm um gene marcador sejam selecionadas em relação àquelas que não o contêm. Em tentativas de acumular múltiplos transgenes em uma única planta, isso pode se tornar particularmente difícil, já que múltiplos genes marcadores selecionáveis são necessários. Adicionalmente, embora vários marcadores selecionáveis tenham sido previamente descritos, muitos não conferem uma característica de nenhum valor agrônômico prático e assim aprovações regulatórias complicadas desnecessárias. Alternativamente, etapas intensivas trabalhosas devem ser

realizadas para tentar gerar marcadores selecionáveis de uma dada planta transgênica. Um gene marcador selecionável com funções duplas de um marcador selecionável e uma característica poderia assim ser especialmente valioso.

- 5 Genes marcadores selecionáveis comumente usados para transformação de planta são neomicina fosfotransferase II, isolada de Tn5 e que confere resistência a canamicina (Fraley *et al.*, 1983) e higromicina fosfotransferase, a qual confere resistência ao antibiótico higromicina (Vanden Elzen *et al.*, 1985). Genes marcadores selecionáveis adicionais de origem
- 10 bacteriana que conferem resistência a antibióticos incluem gentamicina acetil transferase, estreptomicina fosfotransferase, aminoglicosídeo-3'-adenil transferase, e o determinante de resistência à bleomicina (Hayford *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1987; Svab *et al.*, 1990; Hille *et al.*, 1986).

- Outros genes marcadores selecionáveis para transformação de
- 15 planta que não são de origem bacteriana são disponíveis. Estes genes incluem, por exemplo, diidrofolato redutase de camundongo, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase de planta e acetolactato sintase de planta (Eichholtz *et al.*, 1987; Shah *et al.*, 1986; Charest *et al.*, 1990). Dentre alguns herbicidas aos quais genes marcadores selecionáveis conferem re-
- 20 sistência estão glifosato, glifosinato, ou bromoxinil (Comai *et al.*, 1985; Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Stalker *et al.*, 1988).

- Genes que codificam enzimas que inativam herbicidas e outros compostos xenofóbicos foram isolados previamente de uma variedade de organismos procarióticos e eucarióticos. Em alguns casos, estes genes fo-
- 25 ram manipulados geneticamente para expressão bem sucedida em plantas. Através desta abordagem, foram desenvolvidas plantas que são tolerantes aos herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Streber & Willmitzer, 1989), bromoxinila (Stalker *et al.*, 1988), glifosato (Comai *et al.*, 1985) e fosfinotricina (De Block *et al.*, 1987). Embora estas plantas tenham se mostrado valio-
- 30 sas comercialmente, plantas tolerantes a outros herbicidas são necessárias para evitar dependência excessiva em um único herbicida e para aumentar as opções para administrar espécies de pragas difíceis de controlar.

Além dos herbicidas anteriores, há herbicidas similares à auxina que mimetizam ou agem como reguladores naturais do crescimento das plantas chamados auxinas. Herbicidas similares à auxina parecem afetar a plasticidade da parede celular e o metabolismo de ácidos nucleicos, o que
5 pode levar a divisão celular e crescimento descontrolados. Os sintomas de lesão causados por herbicidas similares à auxina incluem torção e flexão epinástica de troncos e pecíolos, encurvamento para cima e enrolamento das folhas, e formato das folhas e forma anormal das veias.

Dicamba é um exemplo de um herbicida similar à auxina e é
10 usado como um herbicida pré-emergente e pós-emergente para o controle de pragas de latifoliados anuais e perenes, e várias pragas de gramíneas em milho, sorgo, pequenos grãos, pasto, feno, pastagem, cana de açúcar, aspargo, turfa, e cultivos de sementes de grama (Crop Protection Reference, 1995). Infelizmente, dicamba pode danificar vários cultivos comerciais e
15 plantas dicotiledôneas tais como soja, algodão, ervilhas, batatas, girassóis, e canola são particularmente sensíveis ao herbicida. Apesar disso, os herbicidas similares à auxina são muito eficazes em controlar o crescimento de pragas, e assim são uma importante ferramenta na agricultura. Isto é compreendido pelo desenvolvimento de pragas tolerantes a outros herbicidas.

20 Recentemente, um gene para dicamba mono-oxigenase (DMO) foi isolado de *Pseudomonas maltophilia*, o qual confere tolerância a dicamba (Pedido de Patente US 20030135879). DMO está envolvido na conversão do herbicida dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico) para um ácido 3,6-diclorosalicílico não-tóxico. Este gene fornece tolerância ao dicamba em
25 plantas que expressam o gene DMO. Entretanto, transformantes que contêm o gene tinham até o momento sido selecionados apenas usando um gene marcador selecionável e técnicas que permitem o uso de um gene de DMO como um marcador selecionável direto não foram descritas. A necessidade de usar um marcador selecionável separado complica a produção de plantas
30 tolerantes a herbicidas similares à auxina por requerer um gene adicional em vetores de transformação usados e também apresenta obstáculos regulatórios.

Dessa forma, há uma necessidade na técnica por novos genes marcadores selecionáveis e novos genes de tolerância a herbicidas. Particularmente necessário é um método para a seleção de células que expressam um gene que confere tolerância a dicamba e outros herbicidas similares à auxina que podem ser selecionados diretamente. Um gene marcador selecionável com a função dupla de um marcador e de uma característica poderia eliminar os custos associados com o preparo e busca de duas unidades de expressão durante o desenvolvimento de um produto e poderia facilitar a produção de plantas que têm novas características valiosas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção fornece um método para selecionar uma célula de planta transformada que compreende as etapas de: (a) colocar uma população de células de planta que compreende uma célula de planta transgênica transformada com um polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase em contato com um meio que compreende um herbicida similar à auxina em uma quantidade que inibe o crescimento de células da população que não tem o polinucleotídeo, em que o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada de: (1) uma sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8, (2) uma sequência de ácido nucleico que compreende a sequência de SEQ ID NO: 7, (3) uma sequência de ácido nucleico que hibridiza a um complemento da sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7 sob condições de SSC 5X, 50% de formamida e 42°C, (4) uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7, e (5) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com a sequência de polipeptídeo de SEQ ID NO:8; e b) selecionar a célula de planta transformada da população de células de planta com base na tolerância exibida pela célula transformada ao herbicida similar à auxina. A população de células pode ser posta em contato com um meio que compreende herbicida similar à auxina por qualquer quantidade de tempo que permita a seleção da célula transgênica. Em certas modalidades, isso pode compreender

pelo menos 1 a 3 horas ou pode ser realizado indefinidamente, por exemplo, por dezenas ou mesmo centenas de dias. Em uma modalidade, o método pode compreender cultivar a população de células de planta em um meio que não tem herbicida similar à auxina antes da etapa a) e/ou etapa a) e etapa b). O meio que não tem herbicida similar à auxina pode conter uma citocinina tal como 6-benzil amino purina (BAP). Em modalidades particulares, a 6-benzil amino purina pode estar em uma concentração de cerca de 10 mg/L de meio ou menos, incluindo cerca de 8; 6; 5; 4,5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1, e cerca de 0,5 mg/L ou menos .

Em certas modalidades da invenção, um polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase não é ligado geneticamente a um gene marcador selecionável ou rastreável diferente de dicamba mono-oxigenase. O polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase pode ser operativamente ligado um peptídeo de trânsito de cloroplasto. Um método da invenção também pode compreender a etapa de: regenerar uma planta transgênica a partir da célula de planta transformada. Em certos aspectos da invenção, a célula de planta transformada é de uma planta dicotiledônea ou monocotiledônea. Exemplos de plantas dicotiledôneas incluem alfafa, feijão, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, algodão, ervilha, colza, e soja e monocotiledôneas incluem milho, cebola, arroz, sorgo, e trigo. Em modalidades específicas, a planta é uma planta de algodão, soja ou canola.

Em certos aspectos, um herbicida similar à auxina é selecionado do grupo que consiste em um composto de ácido fenóxi carboxílico, um composto de ácido benzóico, um composto de ácido piridina carboxílico, um composto de ácido quinolina carboxílico, e um composto de benazolinetila. Em uma modalidade, um composto de ácido fenóxi carboxílico é selecionado do grupo que consiste em ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido 4-(2,4-diclorofenóxi) butírico, e ácido (4-cloro-2-metilfenóxi) acético. Em modalidades específicas, um composto 2,4-diclorofenoxiacético, ácido 4-(2,4-diclorofenóxi) butírico, e/ou ácido (4-cloro-2-metilfenóxi) acético está contido no meio em uma concentração de cerca de 0,001 mg/L a cerca de 10 mg/L, incluindo, por exemplo, de cerca de 0,01 mg/L a cerca de 10 mg/L, de cerca

de 0,01 mg/L a cerca de 5 mg/L, de cerca de 0,1 mg/L a cerca de 5 mg/L, de cerca de 1 mg/L a cerca de 5 mg/L, de cerca de 1 mg/L a cerca de 10 mg/L, de cerca de 5 mg/L a cerca de 10 mg/L, e de cerca de 0,1 mg/L a cerca de 3 mg/L. Em outras modalidades, o ácido benzóico é dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico) e está contido no meio em uma concentração de cerca de 0,001 mg/L a cerca de 10 mg/L, incluindo por exemplo, de cerca de 0,01 mg/L a cerca de 10 mg/L, de cerca de 0,01 mg/L a cerca de 3 mg/L, de cerca de 0,001 mg/L a cerca de 0,1 mg/L, de cerca de 1 mg/L a cerca de 10 mg/L, de cerca de 2 mg/L a cerca de 10 mg/L, e de cerca de 0,001 mg/L a cerca de 1 mg/L. Em modalidades particulares, o meio contém pelo menos dois herbicidas similares à auxina, por exemplo, dicamba e ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Em um método da invenção, a população de células pode compreender um explante de dicotiledônea e a célula de planta transformada pode ser preparada por transformação mediada por *Agrobacterium*.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma célula de planta transgênica que compreende um polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase e é capaz de crescer em meio que compreende 0,01 mg/L de dicamba, em que a dicamba mono-oxigenase não é ligada geneticamente a um gene marcador selecionável ou rastreável e em que o polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em (1) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 8, (2) uma sequência de ácido nucleico que compreende a sequência de SEQ ID NO: 7, (3) uma sequência de ácido nucleico que hibridiza a um complemento da sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7 sob condições de SSC 5X, 50% de formamida e 42°C, (4) uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 70% de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7, e (5) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 70% de identidade de sequência a uma sequência de polipeptídeo de SEQ ID NO: 8. A célula pode ser definida em modalidades particulares como preparada por um método de seleção descrito aqui. A invenção também fornece uma cultura de tecido que compreende tal célula. A

cultura de tecido pode compreender a célula em um meio que compreende um herbicida similar à auxina em uma quantidade que inibe o crescimento de uma célula de planta do mesmo genótipo que a célula de planta transgênica que não tem o polinucleotídeo. A invenção ainda fornece uma planta transgênica regenerada da célula de planta transgênica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Os seguintes desenhos formam parte do presente relatório descritivo e estão incluídos para demonstrar adicionalmente certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem compreendida com referência a um ou mais desses desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas aqui.

FIGURA 1. Resposta de explantes a dicamba com ou sem a adição de BAP. (A) No meio sem dicamba (esquerdo) ou com 0,1 mg/L de dicamba (direita), 13DAT. (B) Os explantes foram inoculados e co-cultivados com *Agrobacterium* por 3 dias, e então cultivadas no meio com 0 (superior à esquerda), 0,1 (superior à direita), 0,5 (superior à direita), 1,0 (inferior à esquerda), 5,0 (inferior ao centro) e 10 (inferior à direita) mg/L dicamba, 11DAT (14DAI). (C) Os explantes também foram inoculados e co-cultivados com *Agrobacterium* por 3 dias, e então cultivados em meio com quantidades diferentes de dicamba combinada com BAP. Da esquerda para a direita: 0; 0,1; 1,0; e 5,0 mg/L de dicamba. De cima para baixo: 0; 1,0; 3,0, 5,0 mg/L de BAP.

FIGURA 2. Exemplos de explantes com pequeno botão GFP+ (acima) ou áreas (abaixo) em experimento (Exp508) com seleção por dicamba. As figuras foram tiradas a 45 DAI sob campo luminoso regular (esquerda) ou luz UV para detectar a expressão de GFP (direita).

FIGURA 3. Evento GFP-positivo de seleção com dicamba. (A) Um pequeno broto observado a 29 DAI sob microscópio de dissecação regular. (B) O mesmo botão mostrou expressão de GFP conforme observado sob luz fluorescente para detectar GFP. (C) O pequeno broto em A&B se desenvolveu em um broto alongado resistente (seta), 48DAI.

FIGURA 4. Resposta de explantes cultivados em meio contendo

0,01 (esquerda), 0,02 (centro) e 0,05mg/L de dicamba, 23DAT (29 DAI).

FIGURA 5. Brotos destacados resistentes foram subcultivados no meio de enraizamento líquido com pequenas esferas de vidro (A) como material de suporte e quase todos os brotos puderam produzir raízes. (B) meio semisólido também pode ser usado para indução de raízes.

FIGURA 6. (A) Flores de soja jovens de uma planta transgênica com gene de CP4 e GUS (superior) e uma planta transformada com pMON73691 através de seleção com dicamba e também carregando um gene de GFP (abaixo). (B) As mesmas duas flores observadas sob um microscópio de dissecação equipado com luz fluorescente para detectar a expressão de GFP. A expressão de GFP foi observada na flor transformada com pMON73691, o qual contém os genes de DMO e GFP. (C, D) A mesma flor transformada com pMON73691 foi aberta para mostrar a expressão de GFP em várias estruturas florais.

FIGURA 7. Explantes de soja cultivados em meio de seleção contendo 0,01 mg/L de dicamba após serem inoculados com *Agrobacterium* carregando diferentes construtos contendo diferentes versões do gene de DMO direcionado com diferentes CTP. (A) pMON73696, DMO-w, com CTP1. (B e D) pMON73698, DMO-c com CTP1. (C) pMON73691, DMO-c, com CTP2. As fotos foram tiradas em 39 (A&B) e 54 DAI (C&D), respectivamente. Brotos resistentes são mostrados por uma seta nos painéis A e C.

FIGURA 8. Mostra a susceptibilidade de *Arabidopsis* selvagem a várias concentrações de dicamba em meio de cultura.

FIG 9. Mostra a recuperação de plantas *Arabidopsis* tolerantes a dicamba transformadas com um polinucleotídeo que codifica DMO.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção fornece em um aspecto, métodos para a seleção de células transformadas com herbicidas similares à auxina tais como dicamba. A invenção supera deficiências na técnica anterior que necessitavam anteriormente o acoplamento de um gene que confere tolerância a herbicidas similares à auxina a um gene marcador selecionável separado a fim de recupe-

rar os transformantes. A seleção direta elimina a necessidade por genes marcadores selecionáveis irrelevantes, os quais podem complicar procedimentos de transformação e aprovação regulatória subsequente de plantas transgênicas. A seleção eficaz de células transgênicas é crucial porque tipicamente apenas um pequeno número de células são transformadas em um protocolo de transformação. Células que sobrevivem à exposição do agente seletivo podem então ser cultivadas em meio que suporta a regeneração de plantas para produzir plantas transgênicas. Pelo uso de um ácido nucleico que codifica dicamba mono-oxigenase (DMO) em particular, a invenção permite a seleção e criação de plantas transgênicas que exibem tolerância a herbicidas similares à auxina, os quais podem ser aplicados a campos que contêm plantas tolerantes a herbicidas para controle eficaz de pragas.

A seleção de células transformadas de acordo com a invenção pode ser realizada, por exemplo, por introduzir primeiramente uma molécula de polinucleotídeo que codifica DMO em um tecido de planta alvo selecionada; colocar as células contendo a célula de planta transformada em contato com um meio que contém um herbicida similar à auxina em uma quantidade que inibe o crescimento de células de planta do mesmo genótipo que a célula de planta transformada que não contém o polinucleotídeo que codifica DMO; e selecionar uma célula de planta capaz de crescer no meio. Desta forma, uma célula transgênica pode ser selecionada a partir de uma população grande de células não-transgênicas. Em uma modalidade exemplar, meio seletivo pode ser modificado para incluir substâncias adicionais tais como reguladores de crescimento. O tecido pode ser mantido em um meio básico com reguladores de crescimento até que tecido suficiente esteja disponível para começar os esforços de regeneração da planta, ou após ciclos repetidos de seleção manual, até que a morfologia do tecido seja adequada para regeneração, tipicamente pelo menos 2 semanas, e então transferida para meio condutor para maturação em plantas. As culturas podem ser transferidas a cada 2 semanas neste meio. O desenvolvimento do broto sinalizará o tempo para transferir para o meio que não tem reguladores de crescimento.

Vários tecidos de planta são passíveis à transformação. A célula de planta pode em certas modalidades vir de um explante de planta, o qual se refere a uma parte cortada de uma planta que é capaz de ser transformada e subsequentemente regenerada em uma planta transgênica. Explantes típicos incluem suspensões celulares, meristemas, embriões maduros ou imaturos, embriões secos, embriões úmidos, embriões ressecados, sementes, calos, cotilédones, nodos cotiledonares, folhas ou caules.

Uma vez que a célula transgênica tenha sido selecionada e tecidos cultivados a partir dela, a presença do DNA exógeno ou "transgene(s)" no tecido ou plantas em regeneração pode ser confirmada usando uma variedade de ensaios. Tais ensaios incluem, por exemplo, ensaios "biológicos moleculares" tais como Southern e northern blotting e PCR™; ensaios "bioquímicos", tais como detectar a presença de um produto de proteína, por exemplo, por meios imunológicos (ELISAs e western blots) ou por função enzimática; ensaios de partes de planta, tais como ensaios de folhas e raízes; e também, por analisar o fenótipo da planta inteira regenerada.

A. Ácidos Nucleicos e Construtos Recombinantes

1. Dicamba mono-oxigenase (DMO)

Em uma modalidade da presente invenção, um construto de DNA que expressa um polipeptídeo de dicamba mono-oxigenase (DMO) é usado como um gene marcador selecionável em células de planta. Polipeptídeos de DMO exemplares são fornecidos neste documento como SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10 ou 12. Ácidos nucleicos exemplares que codificam estas sequências são fornecidos como SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, ou 11. Desta forma, em uma modalidade da invenção, estas sequências são usadas para a seleção de células transformadas. Como é conhecido na técnica, sequências homólogas e derivados destas sequências podem ser facilmente preparados e usados. Por exemplo, um ácido nucleico pode ser usado, o qual codifica um polipeptídeo de DMO que tem pelo menos 70% de identidade de sequência a polipeptídeos fornecidos como SEQ ID No: 2, 4, 6, 8, 10 ou 12, incluindo pelo menos cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais identidade de sequência a tais sequências. Um ácido nucleico tam-

bém pode ser usado, o qual exibe pelo menos 70% de identidade de sequência a uma sequência de ácido nucleico fornecida como SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, ou 11, incluindo pelo menos cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais identidade a tais sequências. Em uma modalidade, a identidade é determinada usando o pacote de programas Sequence Analysis do GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA), MEGAlign (DNASTar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715) com os parâmetros predeterminados. Tais programas pareiam sequências por designar graus de similaridade ou identidade.

Uma molécula de polinucleotídeo que expressa um polipeptídeo de DMO pode ser obtida por técnicas bem-conhecidas na técnica. Variantes de DMOs que têm a capacidade de degradar herbicidas similares à auxina podem ser facilmente preparadas e testadas quanto a atividade de acordo com métodos usuais. Tais sequências também podem ser identificadas por técnicas conhecidas na técnica, por exemplo, a partir de organismos que incluem bactérias que degradam herbicidas similares à auxina tais como dicamba (Pat. U.S. No. 5,445.962; Krueger *et al.*, 1989; Cork & Krueger, 1991; Cork & Khalil, 1995). Um meio de isolar uma sequência de DMO é por hibridização de ácido nucleico, por exemplo, a uma biblioteca construída a partir do organismo fonte, ou por RT-PCR usando mRNA do organismo fonte e iniciadores baseados na DMO descrita. A invenção portanto abrange o uso de ácidos nucleicos que hibridizam sob condições estridentes a uma sequência codificante de DMO descrita aqui. Um versado na técnica compreende que as condições podem ser tornadas menos estridentes por aumentar a concentração de sal e diminuir a temperatura. Desta forma, as condições de hibridização podem ser facilmente manipuladas e desta forma, geralmente serão um método de escolha dependendo dos resultados desejados. Um exemplo de condições de alta estridência é SSC 5X, 50% de formamida e 42°C. Por conduzir uma lavagem sob tais condições, por exemplo, por 10 minutos estas sequências que não hibridizam a uma sequência alvo particular sob estas condições podem ser removidas. Uma modalidade da invenção dessa forma, compreende o uso de um ácido nucleico codifican-

te de DMO que é definido como hibridizante sob condições SSC 5X, 50% de formamida e 42°C por 10 minutos a um ácido nucleico selecionado de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, ou 11.

SEQ ID NO: 1 mostra DMO de *Pseudomonas maltophilia* otimizada para expressão em dicotiledôneas usando uso de códon de *Arabidopsis thaliana*. O polipeptídeo, previsto para ter Ala, Thr, Cys nas posições 2, 3, 112, respectivamente, é dado em SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 3 mostra outra DMO de *Pseudomonas maltophilia* otimizada para expressão em dicotiledôneas e que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4, prevista para ter uma Leu, Thr, Cys nas posições 2, 3, 112, respectivamente. SEQ ID NO: 5 mostra a sequência codificante e SEQ ID NO: 6 o polipeptídeo para DMO otimizada para dicotiledônea prevista para ter Leu, Thr, Trp nas posições 2, 3, 112, respectivamente. SEQ ID NOS: 7 e 8 mostram as sequências codificantes e de polipeptídeo para DMO prevista para ter Ala, Thr, Cys na posição 2, 3, 112, respectivamente. SEQ ID NOS: 9 e 10 mostram a sequência codificante otimizada para dicotiledônea e as sequências de polipeptídeo para DMO previstas para ter Ala, Thr, Trp nas posições 2, 3, 112, respectivamente. SEQ ID NOS: 11 e 12 mostram a sequência codificante e sequências de polipeptídeo para DMO de *Pseudomonas maltophilia* (Pedido de Patente US No: 20030135879).

Variantes também podem ser sintetizadas quimicamente usando as sequências de polinucleotídeo de DMO conhecidas de acordo com técnicas bem-conhecidas na técnica. Por exemplo, sequências de DNA podem ser sintetizadas por química de fosfoamidita em um sequenciador de DNA automático. Síntese química tem várias vantagens. Em particular, a síntese química é desejável porque códons preferidos pelo hospedeiro nos quais a sequência de DNA será expressa podem ser usados para otimizar a expressão. Nem todos os códons precisam ser alterados para se obter expressão melhorada, mas preferivelmente pelo menos os códons raramente usados no hospedeiro são alterados para códons preferidos pelo hospedeiro. Altos níveis de expressão podem ser obtidos por alterar mais do que cerca de 50%, o mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% dos códons preferi-

dos pelo hospedeiro. As preferências de códon de muitas células hospedeiras são conhecidas. As preferências de códon de muitas células hospedeiras são conhecidas (PCT WO 97/31115; PCT WO 97/11086; EP 646643; EP 553494; e Patente U.S. Nos: 5.689.052; 5.567.862; 5.567.600; 5.552.299 e 5.017.692). As preferências de códon de outras células hospedeiras podem ser deduzidas por métodos conhecidos na técnica. Ainda, usando síntese química, a sequência da molécula de DNA ou da sua proteína codificada pode ser facilmente alterada para, por exemplo, otimizar a expressão (por exemplo, eliminar estruturas secundárias de RNAm que interferem com a transcrição ou tradução), adicionar sítios de restrição únicos em pontos convenientes e deletar sítios de clivagem de protease

Modificações e alterações podem ser feitas à sequência de polipeptídeo de uma proteína tais como as sequências de DMO fornecidas neste documento enquanto a atividade enzimática é mantida. A seguir está uma discussão baseada na alteração dos aminoácidos de uma proteína para criar um polipeptídeo equivalente modificado, ou ainda melhorado, e sequências codificantes correspondentes. Em modalidades particulares da invenção, sequências de DMO podem ser alteradas desta maneira e usadas nos métodos da invenção. As alterações de aminoácido podem ser obtidas por alterar os códons da sequência de DNA.

Sabe-se, por exemplo, que certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos em uma estrutura de proteína sem perda apreciável de ligação interativa com estruturas tais como sítios de ligação ou moléculas de substrato. Já que é a capacidade de interação e natureza de uma proteína que define qual a atividade funcional biológica da proteína, certas substituições da sequência de aminoácido podem ser feitas em uma sequência de proteína, e logicamente, na sequência de DNA codificante subjacente, e, no entanto se obter uma proteína com propriedades similares. Desta forma é contemplado que várias alterações podem ser feitas nas sequências de peptídeo de DMO descritas neste documento e sequências de DNA codificantes correspondentes sem perda apreciável de sua utilidade ou atividade biológica.

Ao fazer tais alterações, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A importância do índice hidropático do aminoácido em conferir a função biológica de interação em, uma proteína é geralmente conhecida na técnica (Kyte *et al.*, 1982). É aceito que o caráter hidropático relativo do aminoácido contribui para a estrutura secundária da proteína resultante, o que por sua vez define a interação da proteína com outras moléculas, por exemplo, enzimas, substratos, receptores, DNA, anticorpos, antígenos e similares. A cada aminoácido foi designado um índice hidropático com base na sua hidrofobicidade e características de carga (Kyte *et al.*, 1982), estes são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (−0,4); treonina (−0,7); serina (−0,8); triptofano (−0,9); tirosina (−1,3); prolina (−1,6); histidina (−3,2); glutamato (−3,5); glutamina (−3,5); aspartato (−3,5); asparagina (−3,5); lisina (−3,9); e arginina (−4,5).

É conhecido na técnica que aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos que têm um índice ou escore hidropático similar e ainda resultar em uma proteína com atividade biológica similar, isto é, ainda obter uma proteína funcionalmente equivalente biologicamente. Ao fazer tais alterações, a substituição de aminoácidos cujos índices hidropáticos estão dentro de ± 2 é preferido, aqueles que estão dentro de ± 1 são particularmente preferidos, e aqueles dentro de $\pm 0,5$ são ainda mais particularmente preferidos.

Também é compreendido na técnica que a substituição de aminoácidos similares pode ser feita de forma eficaz com base na hidrofiliabilidade. A patente U.S. 4.554.101 estabelece que a maior hidrofiliabilidade média local de uma proteína, conforme governado pela hidrofiliabilidade de seus aminoácidos adjacentes, se correlacionada com uma propriedade biológica da proteína. Conforme detalhado na Patente U.S. 4.554.101, os seguintes valores de hidrofiliabilidade foram designados para resíduos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato ($+3,0 \pm 1$); glutamato ($+3,0 \pm 1$); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (−0,4); prolina (−0,5 ± 1); alanina (−0,5); histidina (−0,5); cisteína (−1,0); metionina (−1,3); valina

(-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4). Sabe-se que um aminoácido pode ser substituído por outro que tem um valor de hidrofiliçidade similar e ainda se obtém uma proteína biologicamente equivalente. Em tais alterações, a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliçidade estão dentro de ± 2 é preferida, aqueles que estão dentro de ± 1 são particularmente preferidos, e aqueles dentro de $\pm 0,5$ são ainda mais preferidos. Substituições exemplares que levam estas e várias das características anteriores em consideração são bem-conhecidas daqueles versados na técnica e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

2. Construtos de transformação

Um polinucleotídeo que codifica DMO usado de acordo com a invenção como um marcador selecionável será tipicamente introduzido em uma célula como um construto que compreende elementos de controle de expressão necessários para a expressão eficaz de DMO. Métodos de ligar operativamente elementos de controle de expressão a sequências codificantes são bem-conhecidos na técnica (Maniatis *et al.*, 1982; Sambrook *et al.*, 1989). Sequências de controle de expressão são sequências de DNA envolvidas de qualquer forma no controle da transcrição. Sequências de controle de expressão adequadas e métodos de usá-las são bem-conhecidos na técnica. Um promotor em particular pode ser usado, com ou sem elementos intensificadores, região 5' não-traduzida, peptídeos de trânsito ou de sinal para direcionamento de uma proteína ou produto de RNA para uma organela de planta, particularmente para um cloroplasto e regiões 3' não-traduzidas tais como sítios de poliadenilação. Um versado na técnica sabe que vários intensificadores, promotores, íntrons, peptídeos de trânsito, sequências de sinal direcionadoras e regiões 5' e 3' não-traduzidas (UTRs) são úteis no desenho de vetores de expressão de planta eficazes, tais como aqueles descritos, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente U.S. 2003/01403641.

Promotores adequados para o uso atual e outros usos são bem-conhecidos na técnica. Exemplos que descrevem tais promotores incluem a

Patente U.S. 6.437.217 (promotor RS81 de milho), Patente U.S. 5.641.876 (promotor de actina de arroz). Patente U.S. 6.426.446 (promotor de RS324 de milho), Patente U.S. 6.429.362 (promotor de PR-1 de milho), Patente U.S. 6.232.526 (promotor de A3 de milho), Patentes U.S. 6.177.611 (promotores constitutivos de milho), Patentes U.S. 5.322.938. 5.352.605. 5.359.142 e 5.530.196 (promotor 35S), Patente U.S. 6.433.252 (promotor de oleosina L3 de milho), Patente U.S. 6.429.357 (promotor de actina 2 de arroz assim como o íntron de actina 2 de arroz), Patente U.S. 5.837.848 (promotor específico de raiz), Patente U.S. 6.294.714 (promotores induzidos pela luz), Patente U.S. 6.140.078 (promotores induzidos por sal), Patente U.S. 6.252.138 (promotores induzidos por patógenos), Patente U.S. 6.175.060 (promotores induzidos por deficiência de fósforo), Patente U.S. 6.635.806 (promotor de gama-coixina), e Pedido de Patente U.S. No. de série 09/757.089 (promotor de cloroplasto aldolase de milho). Promotores adicionais que podem encontrar uso são um promotor de nopalina sintase (NOS) (Ebert *et al.*, 1987), o promotor de octopina sintase (OCS) (o qual é carregado em plasmídeos indutores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*), os promotores de caulimovírus tais como o promotor 19S de vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Lawton *et al.*, 1987), o promotor 35S de CaMV (Odell *et al.*, 1985), o promotor 35S do vírus do mosaico da escrofulária (Walker *et al.*, 1987), o promotor da sacarose sintase (Yang *et al.*, 1990), o promotor de complexo do gene R (Chandler *et al.*, 1989), e o promotor do gene da proteína de ligação de clorofila a/b, etc. promotores particularmente benéficos para uso com a presente invenção são os promotores CaMV35S, FMV35S, PCISV, AtAnt1 e P-AGRtu.nos (vide também a Tabela 1).

Pode ser obtido benefício para a expressão de genes heterólogos pelo uso de uma sequência que codifica para um peptídeo de trânsito. Peptídeos de trânsito geralmente se referem a moléculas de peptídeo que quando ligadas a uma proteína de interesse direcionam a proteína para um tecido, célula, localização subcelular ou organela celular particular. Exemplos incluem, mas não são limitados a, peptídeos de trânsito de cloroplasto, sinais de direcionamento nuclear, e sinais vacuolares. Um peptídeo de trânsito

sito de cloroplasto é de utilidade particular na presente invenção para direcionar a expressão de uma enzima de DMO para os cloroplastos. É esperado que a função de DMO seja facilitada pelas redutases e ferredoxinas endógenas encontradas em células de planta para degradar dicamba. Cloroplastos de planta são particularmente ricos em redutases e ferredoxinas. Consequentemente, em uma modalidade preferida para a produção de plantas tolerantes a dicamba transgênicas, uma sequência que codifica para um peptídeo pode ser usada, a qual irá direcionar a oxigenase que degrada a dicamba para dentro dos cloroplastos. Alternativamente ou adicionalmente, a redutase e/ou a ferredoxina heteróloga também pode ser expressa em uma célula.

DNA que codifica para uma sequência direcionadora para o cloroplasto pode preferivelmente ser colocada a montante (5') de uma sequência que codifica para DMO, mas também pode ser colocada a jusante (3') da sequência codificante, ou tanto a montante quanto a jusante da sequência codificante. Um peptídeo de trânsito de cloroplasto (CTP) em particular pode ser manipulado para ser fundido à terminação-N de proteínas que são para ser direcionadas para dentro do cloroplasto da planta. Muitas proteínas localizadas no cloroplasto são expressas por genes nucleares como precursores e são direcionadas para o cloroplasto por um CTP que é removido durante as etapas de importação. CTPs úteis podem ser identificados a partir da sequência de aminoácido primária de tais polipeptídeos. Exemplos de proteínas de cloroplastos incluem a subunidade pequena (RbcS2) de ribulose-1,5,-bisfosfato carboxilase, ferredoxina, ferredoxina oxidoredutase, proteína I e proteína II do complexo de colheita de luz, e tioredoxina F. Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que proteínas não-cloroplasto podem ser direcionadas para o cloroplasto pelo uso de proteínas de fusão com um CTP e que um CTP é suficiente para direcionar uma proteína para o cloroplasto. Por exemplo, a incorporação de um peptídeo de trânsito de cloroplasto adequado, tal como, o CTP de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al.*, 1987), e o CTP de EPSPS de *Petunia hybrida* (della-Cioppa *et al.*, 1986) foi mostrado atingir sequências de proteínas EPSPS heterólogas em cloroplastos em plantas

transgênicas. Outras sequências direcionadores para o cloroplasto exemplares incluem a sequência de sinal de cab-m7 de milho (Becker *et al.*, 1992; PCT WO 97/41228) e a sequência de sinal de glutathione sintase de ervilha (Creissen *et al.*, 1991; PCT WO 97/41228). Na presente invenção, AtRbcS4 (CTP1), AtShkG (CTP2), AtShkGZm (CTP2synthetic), e PsRbcS, assim como outros, de benefício, por exemplo, com relação à expressão de um polipeptídeo de DMO (por exemplo, SEQ ID NOs: 17 a 28 para sequências de peptídeo de CTPs e sequências e ácido nucleico que as codificam).

Uma 5' UTR que funciona como uma sequência líder de tradução é um elemento genético de DNA localizado entre a sequência promotora de um gene e a sequência codificante. A sequência líder de tradução está presente no mRNA completamente processado a montante da sequência de início de tradução. A sequência líder de tradução pode afetar o processamento do transcrito primário para RNAm, a estabilidade do RNAm ou a eficácia da tradução. Exemplos de sequências líder de tradução incluem líderes da proteína de choque térmico de milho e petúnia (Patente U.S. No. 5.362.865), líderes da proteína de revestimento de vírus de planta, líderes de rubisco de planta, dentre outros (Turner & Foster, 1995). Na presente invenção, 5' UTRs que podem encontrar benefício em particular são GmHsp, PhDnaK, AtAnt1, TEV, e L-Atnos (vide também a Tabela 1).

A sequência 3' não-traduzida, a região de terminação de transcrição 3', ou a região de poliadenilação significa uma molécula de DNA ligada e localizada a jusante de uma molécula de polinucleotídeo estrutural e inclui polinucleotídeos que fornecem sinais de poliadenilação e outros sinais regulatórios capazes de afetar a transcrição e processamento do mRNA ou expressão gênica. O sinal de poliadenilação funciona em plantas para causar a adição de nucleotídeos de poliadenilato à terminação 3' do precursor de mRNA. A sequência de poliadenilação pode ser derivada do gene natural, de uma variedade de herês de planta, ou de genes de T-DNA. Um exemplo de uma região de terminação de transcrição 3' é a região 3' de nopalina sintase (nos 3'; Fraley *et al.*, 1983). O uso de diferentes regiões 3' não-traduzidas é exemplificado (Ingelbrecht *et al.*, 1989). Moléculas de poliade-

nilação de um gene de RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.*, 1984) e T-AGRtu.nos (Rojiyaa *et al.*, 1987, Acesso no Genbank E01312) em particular podem ser de benefício para uso com a invenção.

Uma unidade de expressão de molécula de polinucleotídeo que
 5 codifica DMO pode ser ligada a uma segunda molécula de polinucleotídeo em uma unidade de expressão que contém elementos genéticos para um marcador rastreável/classificável ou para um gene que confere uma caracte-
 rística desejada. Genes comumente usados para rastrear células presumi-
 velmente transformadas incluem β -glicuronidase (GUS), β -galactosidase,
 10 luciferase, e cloranfenicol acetiltransferase (Jefferson, 1987; Teeri *et al.*, 1989; Koncz *et al.*, 1987; De Block *et al.*, 1984), proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie *et al.*, 1994; Haseloff *et al.*, 1995; e pedido PCT WO 97/41228). Uma AvGFP interrompida por StLS1 foi usada nos exemplos prá-
 ticos para se obter a expressão apenas em células de planta (vide também a
 15 Tabela 1).

A segunda molécula de polinucleotídeo inclui, mas não é limita-
 da a, um gene que fornece uma característica desejável associada com mor-
 fologia, fisiologia, crescimento e desenvolvimento da planta, rendimento, me-
 lhoria nutricional, resistência à doença ou a pragas, ou tolerância ambiental
 20 ou química e pode incluir elementos genéticos que compreendem resistência a herbicidas (Patentes U.S. 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; 5.463.175), aumento do rendi-
 mento (Patentes U.S. RE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098;
 25 5.716.837), controle de insetos (Patentes U.S. 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.593.293; 6.555.655; 6.538.109; 6.537.756; 6.521.442; 6.501.009; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464;
 30 6.093.695; 6.063.756; 6.063.597; 6.023.013; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658. 5.880.275; 5.763.245; 5.763.241), resistência a doenças causa-
 das por fungos (Patentes U.S. 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407;

6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; 6.506.962), resistência a vírus (Patentes U.S. 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; 5.304.730), resistência a nematódeos (Patente U.S. 6.228.992), resistência a doenças bacterianas (Patente U.S. 5.516.671), crescimento e desenvolvimento de plantas (Patentes U.S. 6.723.897; 6.518.488), produção de amido (Patentes U.S. 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), produção modificada de óleos (Patentes U.S. 6.444.876; 6.426.447; 6.380.462), produção elevada óleos (Patentes U.S. 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; 6.476.295), conteúdo de ácido graxo modificado (Patentes U.S. 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; 6.459.018), alta produção de proteínas (Patente U.S. 6.380.466), amadurecimento de frutos (Patente U.S. 5.512.466), nutrição animal e humana aumentada (Patentes U.S. 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; 6.171.640), biopolímeros (Patentes U.S. RE37.543; 6.228.623; 5.958.745 e Publicação de Patente U.S. No. US20030028917), resistência ao estresse ambiental (Patente U.S. 6.072.103), peptídeos farmacêuticos e peptídeos secretáveis (Patentes U.S. 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; 6.080.560), características de processamento melhoradas (Patente U.S. 6.476.295), digestibilidade melhorada (Patente U.S. 6.531.648), baixa quantidade de rafinose (Patente U.S. 6.166.292), produção de enzima industrial (Patente U.S. 5.543.576), sabor melhorado (Patente U.S. 6.011.199), fixação de nitrogênio (Patente U.S. 5.229.114), produção de semente híbrida (Patente U.S. 5.689.041), produção de fibras (Patente U.S. 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; 5.869.720) e produção de biocombustíveis (Patente U.S. 5.998.700). Qualquer um destes ou outros elementos genéticos, métodos e transgenes podem ser usados com a invenção como será observado por aqueles versados na técnica tendo em vista a presente descrição.

Alternativamente, a segunda molécula de polinucleotídeo pode afetar a característica ou o fenótipo da planta mencionado acima por codificar uma molécula de RNA que causa a inibição da expressão de um gene endógeno, por exemplo, através de RNA antisense inibitório (RNAi), ou me-

canismos mediados por co-supressão. O RNA também poderia ser uma molécula de RNA catalítica (isto é, uma ribozima) manipulada para clivar um produto de mRNA endógeno desejado. Desta forma, qualquer molécula de polinucleotídeo que codifica uma molécula de RNA transcrita a qual afeta um fenótipo ou alteração de morfologia de interesse pode ser útil para a prática da presente invenção.

Unidades de expressão podem ser fornecidas em T-DNAs entre as regiões da borda direita (RB) e da borda esquerda de um primeiro plasmídeo junto com um segundo plasmídeo que carrega funções de transferência e integração de T-DNA em *Agrobacterium*. Os construtos também podem conter segmentos de DNA do esqueleto de plasmídeos, os quais fornecem função de replicação e seleção por antibióticos em células bacterianas, por exemplo, uma origem de replicação de *Escherichia coli* tal como ori322, uma origem de replicação de ampla gama de hospedeiros tal como oriV ou oriRi, e uma região que codifica para um marcador selecionável tal como Spec/Strp que codifica para aminoglicosídeo adeniltransferase (aadA) de Tn7 que confere resistência à espectinomicina ou à estreptomicina, ou um gene marcador selecionável para gentamicina (Gm, Gent). Para transformação de planta, a cepa hospedeira bacteriana é frequentemente *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, ou LBA4404. Entretanto, outras cepas conhecidas daqueles versados na técnica de transformação de planta podem funcionar na presente invenção.

3. Preparação de Células Transgênicas

Transformação de células de planta pode ser obtida por qualquer uma das técnicas conhecidas na técnica para introdução de transgenes dentro de células (vide, por exemplo, Miki *et al.*, 1993). Acredita-se que exemplos de tais métodos incluam virtualmente qualquer método pelo qual o DNA pode ser introduzido dentro de uma célula. Métodos que foram descritos incluem eletroporação conforme ilustrado na Patente U.S. No. 5.384.253; bombardeio de microprojéteis conforme ilustrado nas Patentes U.S. Nos. 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; e 6.403.865; transformação mediada por *Agrobacterium* conforme ilustrado nas Patentes U.S.

5.635.055; 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; e 6.384.301; e transformação de protoplasto conforme ilustrado na Patente U.S. No. 5.508.184. Através da especificação de técnicas tais como estas, as células de virtualmente qualquer espécie de planta pode ser transformada estavelmente e selecionada de acordo com a invenção e estas células desenvolvidas em plantas transgênicas.

O método mais amplamente utilizado para introduzir um vetor de expressão em plantas se baseia no sistema de transformação natural de *Agrobacterium* (por exemplo, Horsch *et al.*, 1985). *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias do solo patogênicas para plantas as quais transformam geneticamente as células de planta. Os plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente, carregam genes responsáveis pela transformação genética da planta (por exemplo, Kado, 1991). Descrições de sistemas de vetores de *Agrobacterium* e de métodos para a transferência gênica mediada por *Agrobacterium* são fornecidas por várias referências, incluindo Gruber *et al.*, supra, Miki *et al.*, supra, Moloney *et al.*, 1989, e Patente U.S. Nos: 4.940.838 e 5.464.763. Outras bactérias tais como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, e *Mesorhizobium* as quais interagem naturalmente com plantas podem ser modificadas para mediar a transferência gênica a várias plantas diferentes. Estas bactérias simbióticas associadas às plantas podem ser tornadas competentes para transferência gênica pela aquisição de um plasmídeo Ti desarmado e de um vetor binário adequado (por exemplo, Brothaerts *et al.*, 2005; Pedido de Patente U.S. 11/749.583).

B. Meios de Culturas de Tecido

De acordo com a invenção, células transgênicas podem ser selecionadas pelo menos de meios que contêm uma quantidade de herbicida similar à auxina que inibe o crescimento de uma célula que não tem a expressão de um polipeptídeo de DMO. "Meios" se refere às várias misturas de nutrientes que são usadas para cultivar células *in vitro*, isto é, fora do organismo vivo intacto. O meio é geralmente uma suspensão de várias categorias de ingredientes (sais, aminoácidos, reguladores de crescimento, açúcares, tampões) que são necessários para o crescimento da maioria dos tipos

celulares. Entretanto, cada tipo celular específico requer uma gama específica de proporções de ingredientes para o crescimento, e uma gama ainda mais específica de fórmulas para o crescimento otimizado. A taxa de crescimento celular também variará entre várias culturas iniciadas com a variedade de meios que permitem o crescimento daquele tipo celular.

A regeneração de uma célula de planta transformada pode ser obtida por primeiramente cultivar o explante um meio de brotamento e subsequentemente em um meio de enraizamento. De acordo com a invenção estes meios geralmente incluem um herbicida similar à auxina tal como dicamba como o agente de seleção além de nutrientes e reguladores do crescimento. Uma variedade de meios e exigências de transferência pode ser implementada e otimizada para cada sistema de planta para a transformação das plantas e recuperação das plantas transgênicas. Consequentemente, tais meios de condições de cultura descritos na presente invenção podem ser modificados ou substituídos por componentes nutricionalmente equivalentes, e ainda estão dentro do escopo da presente invenção.

O meio nutritivo é preparado como um líquido, mas ele pode ser solidificado por adicionar o líquido a materiais capazes de fornecer um suporte sólido. O ágar é o mais comumente usado para esta finalidade. Bactagar, ágar de Hazelton, Gelrite, e Gelgro são tipos específicos de suportes sólidos que são adequados para o crescimento de células de planta em cultura de tecidos. Alguns tipos de célula crescem e se dividem tanto em suspensão líquida quanto em meio sólido.

Alvos de células receptoras incluem, mas não são limitados a, células de meristema, calos, embriões imaturos e células gaméticas tais como pólen de microesporos, esperma e células ovo. Qualquer célula da qual uma planta transgênica, incluindo uma planta transgênica estéril, pode ser regenerada pode ser usada em certas modalidades. Por exemplo, embriões imaturos podem ser transformados seguido por seleção e iniciação dos calos e subsequente regeneração das plantas transgênicas. A transformação direta de embriões imaturos torna óbvia a necessidade do desenvolvimento de longo prazo de culturas de células receptoras. Células meristemáticas (isto

é, células de planta capazes de divisão celular contínua e caracterizadas por uma aparência citológica indiferenciada, normalmente encontradas nos pontos ou tecidos de crescimento em plantas tais como pontas de raízes, ápices de caules, galhos laterais, etc) também podem ser usadas como uma célula de planta receptora. Por causa do seu crescimento indiferenciado e capacidade para diferenciação de órgãos e totipotência, uma única célula meristemática transformada poderia ser recuperada como uma planta transformada inteira.

Células somáticas são de vários tipos. Células embriogênicas são um exemplo de células somáticas que podem ser induzidas para regenerar uma planta através da formação de embrião. Células não-embriogênicas são aquelas que tipicamente não responderão de tal forma.

Certas técnicas podem ser usadas, as quais enriquecem as células receptoras dentro de uma população celular. Por exemplo, desenvolvimento de calo do Tipo II, seguido por seleção manual e cultura de tecido embriogênico friável, geralmente resulta em um enriquecimento de células receptoras para uso, por exemplo, na transformação por microprojéteis.

A seleção em cultura pode ser realizada após a transformação de células de planta usando uma variedade de métodos de transformação. Transformação por *Agrobacterium* seguida por seleção é descrita nos exemplos práticos abaixo. Além disso, procedimentos exemplares para a seleção de células transformadas preparadas por bombardeio de microprojéteis são fornecidos como segue:

1. O tecido (suspensão) é plaqueado sobre filtros, bombardeado com microprojéteis e então os filtros são transferidos para o meio de cultura. Após 2 a 7 dias, os filtros são transferidos para meio seletivo. Aproximadamente 3 semanas após o bombardeio, o tecido é retirado dos filtros como aglomerados de calos separados em meio seletivo fresco.

2. Conforme o item 1 acima, exceto após o bombardeio a suspensão é colocada de volta em líquido – submetida a seleção em líquido por 7 a 14 dias e então pipetada em uma baixa densidade sobre placas de seleção frescas.

3. O calo é bombardeado enquanto se localiza diretamente sobre o meio ou sobre os filtros. As células são transferidas para meio seletivo 1 a 14 dias após o bombardeio de partículas. O tecido é transferido para filtros 1 a 3 vezes em intervalos de 2 semanas para meio seletivo fresco. O
5 calo é então rapidamente colocado em líquido para dispersar o tecido sobre as placas seletivas em uma baixa densidade.

4. O tecido do calo é transferido para placas seletivas um a sete dias após a introdução do DNA. O tecido é subcultivado como pequenas unidades de calos sobre placas seletivas até que os transformantes são
10 identificados.

Em certas modalidades, as células receptoras são selecionadas após o cultivo em cultura. As células cultivadas podem ser crescidas tanto sobre suportes sólidos quanto na forma de suspensões líquidas. Em qualquer caso, os nutrientes podem ser fornecidos às células na forma de meios,
15 e as condições ambientais controladas. Há vários tipos de meios de cultura de tecidos compreendidos de aminoácidos, sais, açúcares, reguladores de crescimento e vitaminas. A maioria dos meios empregados na prática da invenção terá alguns componentes similares, embora o meio possa diferir em composição e proporções de ingredientes de acordo com práticas de cultura
20 de tecido conhecidas. Por exemplo, vários tipos celulares geralmente crescem em mais do que um tipo de meio, mas exibirão diferentes taxas de crescimento e diferentes morfologias, dependendo do meio de crescimento. Em alguns meios, as células sobrevivem, mas não se dividem. A composição do meio também é frequentemente otimizada com base na espécie ou
25 no tipo celular selecionado.

Vários tipos de meios adequados para cultivo de células de planta foram anteriormente descritos. Exemplos de tais meios são definidos abaixo. Em algumas modalidades, pode ser preferível usar um meio com alguma proporção de amônia/nitrato tal como N6 para promover a geração de
30 células receptoras por manter as células em um estado pró-embrionário capaz de divisões sustentadas. Em certas modalidades da presente invenção Woody Plant Medium (WPM) foi usado (Lloyd & McCown, 1981).

O método de manutenção de culturas celulares pode contribuir para sua utilidade com fontes de células receptoras para transformação. A seleção manual de células para transferência para meio de cultura fresco, frequência de transferência para meio de cultura fresco, composição de meio de cultura, e fatores ambientais que incluem, mas não são limitados a, qualidade de quantidade de luz, e temperatura são todos os fatores na manutenção das culturas de calo e/ou suspensão que são úteis como fontes de células receptoras. Alternar os calos entre diferentes condições de cultura pode ser benéfico no enriquecimento para células receptoras dentro de uma cultura. Por exemplo, as células podem ser cultivadas em cultura em suspensão, mas transferidas para meio sólido em intervalos regulares. Após um período de crescimento em meio sólido, as células podem ser selecionadas manualmente para retornar para meio de cultura líquido. A repetição desta sequência de transferências para meio de cultura fresco pode ser usada para enriquecer as células receptoras. Passar as culturas celulares através de uma peneira de 1,9 mm também pode ser útil para manter a friabilidade de um calo ou de uma cultura em suspensão e enriquecer para células transformáveis quando tais tipos celulares são usados.

C. Plantas Transgênicas

Uma vez que uma célula transgênica tenha sido selecionada a célula pode ser regenerada em uma planta transgênica usando técnicas bem-conhecidas. As plantas transformadas podem ser subsequentemente analisadas para determinar a presença ou ausência de um ácido nucleico particular de interesse contido em um construto de DNA. Análises moleculares podem incluir, mas não são limitadas a Southern blots (Southern, 1975), análise de northern blot, análise de western blot, ou análise de PCR, abordagens de imunodiagnóstico, e avaliações de campo. Estes e outros métodos podem ser realizados para confirmar a estabilidade das plantas transformadas produzidas pelos métodos descritos. Estes métodos são bem-conhecidos daqueles versados na técnica (Sambrook *et al.*, 1989).

Plantas transgênicas tolerantes a herbicidas similares à auxina podem ser produzidas. Em particular, plantas economicamente importantes,

incluindo cultivos, árvores frutíferas, e plantas ornamentais e árvores que são atualmente conhecidas por serem lesionadas por herbicidas similares à auxina podem ser transformadas com os construtos de DNA da presente invenção para que elas se tornem tolerantes ao herbicida. As plantas que

5 são atualmente consideradas tolerantes a herbicidas similares à auxina podem ser transformadas para aumentar sua tolerância ao herbicida. Exemplos de plantas que podem encontrar uso em particular com a presente invenção incluem, mas não são limitadas a, alfafa, feijão, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, algodão, pepino, berinjela, alface, melão, ervilha, pimenta,

10 abóbora, rabanete, colza, soja, abóbora, tomate, melancia, milho, cebola, arroz, sorgo, trigo, centeio, painço, cana de açúcar, aveia triticales, grama e grama.

Uma vez que uma planta transgênica que contém uma transgene tenha sido preparada, este transgene pode ser introduzido em qualquer

15 planta sexualmente compatível com a primeira planta por cruzamento, sem a necessidade por transformar diretamente a segunda planta. Portanto, conforme usado neste documento, o termo "progênie" denota a descendência de qualquer geração de uma planta parental preparada de acordo com a presente invenção, em que a progênie compreende um construto de DNA

20 selecionado preparado de acordo com a invenção. Uma "planta transgênica" pode então ser de qualquer geração. O "cruzamento" de uma planta para fornecer uma linhagem de planta que tem um ou mais transgenes ou alelos adicionados em relação a uma linhagem da planta inicial, conforme descrito neste documento, é definido como as técnicas que resultam em uma se-

25 quência particular sendo introduzida em uma linhagem de planta por cruzamento de uma linhagem inicial com uma planta doadora que compreende um transgene ou alelo da invenção. Para se obter isto, por exemplo, seria possível realizar as seguintes etapas: (a) sementes de planta da primeira (linhagem inicial) e segunda (linhagem da planta doadora que compreende

30 um transgene ou alelo desejado) plantas parentais. (b) cultivar as sementes da primeira a segunda plantas parentais em plantas que possuem flores; (c) polinizar uma flor da primeira planta parental com o pólen da segunda planta

parental; e (c) colher as sementes produzidas na planta parental que possui a flor fertilizada.

D. Definições

Conforme usado neste documento, o termo "transformado" refere-se a uma célula, tecido, órgão ou organismo dentro do qual foi introduzida uma molécula de polinucleotídeo estranha, tal como um construto. A molécula de polinucleotídeo introduzida pode ser integrada no DNA genômico da célula, órgão ou organismo receptor tal que a molécula de polinucleotídeo introduzida seja herdada pela progênie subsequente. Uma célula ou organismo "transgênico" ou "transformado" também inclui a progênie da célula ou organismos e a progênie produzida a partir de um programa de cruzamento que emprega tal planta transgênica como um progenitor em um cruzamento e que exhibe um fenótipo alterado que resulta da presença de uma molécula de polinucleotídeo estranha.

"Colocar em contato" a célula de planta transformada com um meio de cultura e tecido que contém um herbicida similar à auxina pode ser obtido por cultivar a célula da planta em um meio de cultura de tecido que contém um herbicida similar à auxina.

"Meio de cultura de tecido" refere-se a um meio líquido, semisólido ou sólido usado para suportar o crescimento e o desenvolvimento de plantas em um ambiente diferente do solo. Meios de cultura de tecido de planta adequados são conhecidos do versado na técnica e podem incluir meio baseados em MS (Murashige & Skoog, 1962) ou meios baseados em N6 (Chu *et al.*, 1975) suplementados com reguladores do crescimento de plantas adicionais tais como auxinas, citocinas, cinetina, ABA, e giberelinas. Outros aditivos de meios podem incluir, mas não são limitados a aminoácidos, macronutrientes, ferro, micronutrientes, inositol, vitaminas e orgânicos, carboidratos, componentes indefinidos do meio tais como hidrosilatos de caseína, com ou sem um agente gelificante apropriado tal como uma forma de ágar, tal como uma agarose de baixo ponto de fusão ou Gelrite® se desejado para preparar meio semisólido ou sólido. Aqueles versados na técnica são familiares com a variedade de meios de cultura de tecidos, os quais

quando suplementados apropriadamente, suportam o crescimento e o desenvolvimento do tecido da planta e são adequados para a transformação e regeneração da planta. Estes meios de cultura de tecido podem ser comprados como uma preparação comercial ou ser preparados e modificados de forma customizada. Exemplos de tais meios incluem, mas não são limitados a Murashige & Skoog (1962), N6 (Chu *et al.*, 1975), Linsmaier & Skoog (1965), Uchimiya & Murashige (1962), meios de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968), meio D (Duncan *et al.*, 1985), meio de planta de McCown's Woody (McCown & Lloyd, 1981), Nitsch & Nitsch (1969), e Schenk & Hildebrandt (1972) ou derivações destes meios suplementados de acordo. Aqueles versados na técnica estão cientes de que meios e suplementos de meios tais como nutrientes e reguladores de crescimento para uso na transformação e regeneração e outras condições de cultura tais como a intensidade de luz durante a incubação, pH, e temperatura de incubação podem ser otimizadas para uma planta de interesse.

"Herbicidas similares à auxina" também são chamados herbicidas auxínicos ou reguladores do crescimento ou herbicidas do Grupo 4 (com base no seu modo de ação). Estes herbicidas mimetizam ou agem como os reguladores naturais das plantas chamados auxinas. As auxinas incluem hormônios naturais tais como ácido indol acético e ácido naftaleno acético, ambos os quais são responsáveis pelo alongamento celular nas plantas. O modo de ação dos herbicidas auxínicos é que eles parecem afetar a plasticidade da parede celular e o metabolismo dos ácidos nucleicos, o que pode levar à divisão e ao crescimento celular descontrolados. O grupo de herbicidas similares à auxina inclui quatro famílias químicas: fenóxi, ácido carboxílico (ou piridina), ácido benzóico, e a mais nova família do ácido quinalinacarboxílico. Ácidos fenoxicarboxílicos: os herbicidas de fenóxi são os mais comuns e têm sido usados como herbicidas desde os anos de 1940 quando o ácido (2,4-diclorofenóxi)acético (2,4-D) foi descoberto. Outros exemplos incluem ácido 4-(2,4-diclorofenóxi)butírico (2,4-DB), ácido 2-(2,4-diclorofenóxi)propanóico (2,4-DP), ácido (2,4,5-triclorofenóxi)acético (2,4,5-T), ácido 2-(2,4,5-triclorofenóxi) propiônico (2,4,5-TP), 2-(2,4-dicloro-3-

metilfenóxi)-N-fenilpropanamida (clomeprop), ácido (4-cloro-2-metilfenóxi) acético (MCPA), ácido 4-(4-cloro-o-tolilóxi) butírico (MCPB), e ácido 2-(4-cloro-2-metilfenóxi) propanóico (MCPB).

Ácidos piridinacarboxílicos: a seguinte maior família química é da dos herbicidas de ácidos carboxílicos, também chamados herbicidas de piridina. Exemplos incluem ácido 3,6-dicloro-2-piridinacarboxílico (Clopyralid), ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico (picloram), ácido (2,4,5-triclorofenóxi) acético (triclopyr), e ácido 4-amino-3,5-dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético (fluroxipyr). Ácidos Benzoicos: exemplos incluem ácido 3,6-dicloro-o-anísico (dicamba) e ácido 3-amino-2,5-diclorobenzóico (choramben). Ácidos quinalinacarboxílicos: a quarta e mais nova família de herbicidas auxínicos é a família do ácido quinalinacarboxílico. Exemplo inclui ácido 3,7-dicloro-8-quinolinacarboxílico (quinclorac). Este herbicida é único em que ele também controla algumas pragas de gramíneas, diferente de outros herbicidas similares à auxina que controlam essencialmente plantas latifoliadas e dicotiledôneas. O outro herbicida nesta categoria é o ácido 7-cloro-3-metil-8-quinolinacarboxílico (quinmerac).

Um "efeito de herbicida similar à auxina" significa sintomas de injúria causados por herbicidas similares à auxina, estes incluem torção e flexão epinástica de troncos e pecíolos, encurvamento para cima e enrolamento das folhas, e formato das folhas e venação anormais. Todos estes herbicidas translocam, com alguns translocando mais do que outros. Alguns destes herbicidas têm atividade no solo e alguns podem persistir no solo por períodos de tempo bastante longos. Devido ao seu efeito, eles são amplamente usados em muitos cultivos incluindo cereais de pequenos grãos, milho, arroz, e outros cultivos de gramíneas, relva, pastagens, locais industriais e que não são de cultivos agrícolas.

"Selecionar" a célula de planta transformada que é tolerante a um herbicida similar à auxina pode ser obtido por métodos descritos na presente invenção. Resumidamente, pelo menos uma das células de planta em uma população de células iniciais é transformada com um construto de DNA que contém uma molécula de polinucleotídeo que codifica DMO. A popula-

ção resultante de células de planta é colocada em um meio de cultura contendo um herbicida similar à auxina em uma concentração selecionada tal que as células de planta transformadas crescerão, enquanto que as células das plantas não-transformadas não crescerão. Concentrações adequadas de um herbicida similar à auxina podem ser determinadas empiricamente. Antes da seleção, os explantes podem ser cultivados em um meio sem o herbicida similar à auxina. Tal meio é chamado meio de retardo. Os explantes podem ser colocados no meio de retardo para permitir que cresçam por algum tempo antes de serem colocados no meio de seleção. Os regimes de seleção poderiam ser otimizados dependendo do herbicida similar à auxina em particular e do sistema do explante. Frequentemente múltiplas etapas de seleção são usadas e quantidades variadas de agente de seleção podem ser usadas em cada etapa.

"Tolerante" significa que as células de planta transformadas são capazes de sobreviver e se regenerar em plantas quando colocadas em um meio de cultura que contém um nível de um herbicida similar à auxina que evita que as células não-transformadas o façam. "Tolerante" também significa que as plantas transformadas são capazes de crescer após a aplicação de uma quantidade de um herbicida similar à auxina que inibe o crescimento de plantas não-transformadas.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir estão incluídos para ilustrar modalidades da invenção. Deverá ser observado por aqueles versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção. Entretanto, aqueles versados na técnica podem, tendo em vista a presente descrição, observar que várias alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que estão descritas e ainda obter um resultado igual ou similar sem se afastar do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, ficará claro que certos agentes que são tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados podem ser substituídos por agentes descritos neste documento embora resultados iguais ou similares venham a ser obtidos. To-

dos os tais substitutos similares e modificações aparentes para aqueles versados na técnica são considerados estar dentro do espírito, escopo e conceito da invenção como definida pelas reivindicações anexas.

Exemplo 1

5 Preparação de construtos de polinucleotídeo que codificam DMO

Vários vetores binários foram preparados para testar a habilidade de moléculas de polinucleotídeos que codificam DMO em permitir a seleção de células de soja transformadas. Elementos genéticos usados para preparar os vetores binários são dados na Tabela 1 e incluem um intensificador e promotor 35S de CaMV (Patentes U.S. Nos. 5.322.938; 5.352.605; 5.359.142; e 5.530.196); líder não-traduzida de GmHsp do gene Hsp17.9 de *Glycine max* (Patente U.S. 5.659.122); AvGFPI que codifica a região para os primeiros 126,3 aminoácidos da proteína GFP de *Aequorea victoria* (Patentes U.S. 5.491.084; 6.146.826) com uma substituição de serina por treonina no aminoácido 65 e otimizada para expressão em planta; um segundo íntron StLS1 do gene LS1 gene de *Solanum tuberosum* (Eckes *et al.*, 1986); uma região codificante de AvGFPII para os últimos 112,6 aminoácidos da proteína GFP de *Aequorea victoria* (Patentes U.S. 5.491.084; 6.146.826) otimizada para expressão em planta; uma região T-Atnos 3' não traduzida do gene de nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (Rojiyaa *et al.*, 1987, Acesso no GenBank E01312); um promotor 35S do Vírus do Mosaico da Escrofulária FMV (Patentes U.S. 6.051.753; 5.378.619); líder não-traduzida PhDNAK do gene Hsp70 de *Petunia hybrida* (Patente U.S. 5.362.865); e uma região codificante de AtRbcS4 (CTP1) para peptídeo de trânsito SSU1A de *Arabidopsis*. O último elemento inclui o peptídeo de trânsito, 24 aminoácidos da proteína madura e uma repetição dos 6 últimos aminoácidos do peptídeo de trânsito (Patente U.S. 5.728.925). Também foi usada uma região codificante de AtShkG (CTP2) para o peptídeo de trânsito de 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) de *Arabidopsis thaliana*. Esse elemento varia a partir da sequência selvagem (Klee *et al.*, 1987) em que o último códon foi substituído de GAG (ácido glutâmico) para TGC (cis-

teína). Foi usado um elemento AtShkGzmcodon (CTP2syn) que é igual a AtShkG (CTP2) mas otimizado para expressão em planta usando códons de *Zea mays* (vide SEQ ID NO:14 de WO04009761). Foi usada uma região PmDMOCys112Atcodon para dicamba mono-oxigenase de *Pseudomonas maltophilia* (Pedido de Patente U.S. 20030115626) que tem uma cisteína na posição 112 e otimizada para expressão em dicotiledôneas usando códons de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NOs: 1, 3, 7). Para o desenho do construto também foram usados uma região codificante PmDMOTrp112Atcodon para dicamba mono-oxigenase de *Pseudomonas maltophilia* (pedido de patente US 20030115626) que tem um triptofano (Trp) na posição 112 e é otimizada para expressão em dicotiledônea usando códons de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NOs: 5, 9); uma região PsRbcS2: 3' de poliadenilação do gene RbcS2-E9 de *Pisum sativum* (Coruzzi *et al.*, 1984); um promotor/intron A-tAnt1 e líder do gene translocador do nucleotídeo adenina 1 de *Arabidopsis thaliana*; uma região codificante AtaroA-CP4 para *aroA*-CP4 que não ocorre naturalmente (Patente U.S. 5.633.435) manipulada para expressão em plantas; uma líder não traduzida TEV 5' do RNA do vírus Etch do Tabaco (Carrington & Freed, 1990); um peptídeo de trânsito de cloroplasto PsRbcS da subunidade pequena da ribulose 1.5-bisfosfato carboxilase de ervilha e os primeiros 24 aminoácidos da proteína madura de rubisco (Coruzzi *et al.*, 1984); um promotor P-Atnos para nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* pTiT37 (Acesso no GenBank V00087; Depicker *et al.*, 1982; Bevan *et al.*, 1983); uma região 5' não traduzida L-At.nos 5' do gene de nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* pTiT37 (Acesso no GenBank V00087; Bevan *et al.*, 1983), e um promotor PCISV para o transcrito de extensão completa do vírus do estriado clorótico do amendoim. O último elemento tem uma duplicação de 179 nt em repetições diretas com 6 nt entre a repetição seguido pela região de 70 bp contendo o TATA box (Patente US 5.850.019). Variantes da molécula de polinucleotídeo que codifica diferentes CTPs e DMO estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 1. Elementos genéticos usados para construir T-DNAs

Construto	Unidade de Expressão 1						Unidade de Expressão 2				
	Promo- tor	5'UTR	CR	Intron	CR	PoliA	Promo- tor	5' UL	TS	CR	Poly A
pMON73690	CaMV	GmHsp	AvGFPI	StLS1	AvGF- PII	T-Atnos	FMV	PhD- naK	None	PmD- MOCys ₁₁₂ Atcodon	PsRbcS2
pMON73691	CaMV	GmHsp	AvGFPI	StLS1	AvGF- PII	T-Atnos	FMV	PhD- naK	AtShkG	PmD- MOCys ₁₁₂ Atcodon	PsRbcS2
pMON73696	CaMV	GmHsp	AvGFPI	StLS1	AvGF- PII	T-Atnos	FMV	PhD- naK	AtRbcS4	PmDMO- Trp ₁₁₂ Atcodon	PsRbcS2
pMON73698	CaMV	GmHsp	AvGFPI	StLS1	AvGF- PII	T-Atnos	FMV	PhD- naK	AtRbcS4	PmD- MOCys ₁₁₂ Atcodon	PsRbcS2
	Promo- tor	5'UR	TS	CR			Promo- tor	5' UL	TS	CR	Poly A
pMON73724	AtAnt1	AtAnt1	At.ShkG	At.aroA- CP4	PsRbcS2		PCISV	TEV	AtShkGZm- codon	PmDMOTrp ₁₁₂ Atcodon	Atnos

continuação

Construto	Primeiro T-DNA					Segundo T-DNA				
	Promo- tor	5'UTR	TS	CR	PoliA	Promo- tor	5' UL	TS	CR	Poly A
pMON58498	PCISV	TEV	Ps- RbcS	PmDMO Cys ₁₁₂	PsRbcS2	FMV	PhD- naK	AtShkG	AtaroA-CP4	PsRbcS2
pMON84254	PCISV	TEV	Ps- RbcS	PmDMO Cys ₁₁₂	PsRbcS2	P-Atnos	L-Atnos	Nenhum	Sh.bar	T-Atnos

Chave: 5'UTR: região 5' não-traduzida; CR: região codificante; Poli A: região de poliadenilação; e TS: sequência de trânsito.

Tabela 2. Peptídeos de trânsito de cloroplasto e polinucleotídeos que codificam DMO usados nos vetores binários.

Construto	Variante de CTP	Variante de DMO	SEQ ID	Extensão	aa previstos na posição 2	aa previstos na posição 112
pMON73690	Nenhuma	DMO-Cys ₁₁₂ e códon otimizado para dicotiledôneas	1	1023	Ala	Cys
pMON73691	CTP2	DMO-Cys ₁₁₂ e códon otimizado para dicotiledôneas	3	1023	Leu	Cys
pMON73696	CTP1	DMO-Trp ₁₁₂ e códon otimizado para dicotiledôneas	5	1023	Leu	Trp
pMON73698	CTP1	DMO-Cys ₁₁₂ e códon otimizado para dicotiledôneas	3	1023	Leu	Cys
pMON58498	PsRbcS	DMO-Cys ₁₁₂	7	1023	Ala	Cys
pMON84254	PsRbcS	DMO-Cys ₁₁₂	7	1023	Ala	Cys
pMON73724	CTP2Zm	DMO-Trp ₁₁₂ e códon otimizado para dicotiledôneas	9	1023	Ala	Trp

No caso de pMON73690, pMON73691, pMON73696, e pMON73698, a molécula de polinucleotídeo que codifica DMO foi ligada a um marcador GFP rastreável e fornecida sobre o mesmo T-DNA para mostrar que a molécula de polinucleotídeo que codifica DMO pode ser usada com outro gene. No caso de pMON58498, pMON84254, e pMON73724, a molécula de polinucleotídeo que codifica DMO não foi ligada do outro transgene (marcador selecionável ou gene de característica agronômica) por separá-los em dois T-DNAs.

Exemplo 2

Desenvolvimento do método de seleção

Sementes maduras de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. A3525 foram embebidas, esterilizadas e germinadas em temperatura ambiente conforme descrito abaixo. Outros exemplos de genótipos de soja que podem ser facilmente usados incluem, mas não são limitados a, Jack, Williams, Bert, Thorne, Granite, Lambert, Chapman, e Kunitz. Resumidamente, sementes secas (cerca de 770 g) foram imersas por 3 min em 2 L de solução de hipoclorito de sódio 200 ppm feita com Clorox comercialmente disponível. A solução foi drenada e as sementes foram deixadas de lado por cerca de 2 horas. Cerca de 2 L de meio de esterilização/germinação de feijão foram então adicionados as sementes. Após cerca de 9 a 10 horas, as sementes estavam prontas para excisão manual dos explantes. O meio de germinação de feijão continha o seguinte em mg/L -- NH_4NO_3 : 240, KNO_3 : 505, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 176, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 493, KH_2PO_4 : 27, H_3BO_3 : 1,86, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,216, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,07, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,58, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,502, KI: 0,249, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 3,348, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,0008, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,0008, B1: 1,34, B3: 0,5, B6: 0,82, Bravo (75% WP; Diamond Shamrock Company, Cleveland, Ohio): 30, Captan (50% WP; Micro Flo Company, Lakeland, FL): 30, Cefotaxima: 125, e Sacarose: 25000, pH 5.8).

Para excisão de explantes com máquina, as sementes foram tratadas com 2 L de solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 15 min. Após a drenagem da solução, as sementes foram lavadas com 2 L de água destilada estéril por 1 min. A máquina e o método para excisão mecânica estão

descritos no Pedido Publicado de Patente US20050005321. Resumidamente, as sementes embebidas foram passadas através de três conjuntos de cilindros na máquina, com água destilada estéril correndo sobre elas e esmagadas. Uma mistura de cotilédones, coberturas de semente e os explantes (eixo do embrião) é coletada e peneirada tanto manualmente quanto usando um equipamento de peneiração automática para recuperar os explantes. Os explantes foram lavados com etanol 0,05% por 1 min, seguido por duas lavagens com água destilada estéril para a remoção de mais resíduos.

Os vetores binários descritos acima foram mobilizados em cepa desarmada C58 (ABI) de *Agrobacterium tumefaciens*. O inóculo de *Agrobacterium* para infecção foi preparado como segue: 250 ml de meio LB (Luria-Bertani; Difco, Detroit, MI) contendo canamicina 50 mg/L (Sigma, St. Louis, MO) e espectinomicina 75 mg/L (Sigma, St. Louis, MO) foram inoculados com 0,5 ml de solução estoque de *Agrobacterium* em glicerol (Acros Organics, Geel, Belgium) e foram agitados a 200 rpm a 28°C por aproximadamente 20 a 22 h até que a OD₆₆₀ alcançou 0,8 a 1,0. O caldo de *Agrobacterium* foi então centrifugado por 25 min a 3500 rpm (cerca de 3565 g) a 2 a 4°C. Após remover o sobrenadante, o pélete de *Agrobacterium* foi ressuspenso em meio de inoculação contendo 2/5x de macronutrientes, 1/10x de micronutrientes e vitaminas do meio Gamborg's B5, suplementado com 3,9 g/l de MES (Sigma, St. Louis, MO), e 30 g/l de glicose (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS), pH 5.4. Ácido lipóico (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado à suspensão de *Agrobacterium* até uma concentração final de 0,25 mM após a densidade da suspensão celular de *Agrobacterium* ser ajustada para uma OD₆₆₀ de 0,30 a 0,35.

A infecção por *Agrobacterium* e o co-cultivo dos explantes foram conduzidos como se segue: cerca de 100 explantes excisados foram distribuídos na tampa de um frasco de cultura de plástico estéril PLANTCON (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA). Cinco ml de inóculo de *Agrobacterium* foram adicionados em cada tampa de PLANTCON. Os explantes foram então sonificados por 20 seg em um sonicador (Ultrasonic Multi Cleaner, Model W-113, Honda, Japão). Um pedaço de filtro de papel Whatmann #1 (Whatman Inc.,

Clifton, NJ) cortado do tamanho do fundo do PLANTCON foi colocado sobre a parte do fundo do PLANTCON. Os explantes foram transferidos da tampa para o filtro de papel com o inóculo de *Agrobacterium*. Os PLANTCON foram então incubados em uma incubadora Percival com 16 h de luz (em cerca de 5 85 a 90 μ E) e 8 h de fotoperíodo de escuro e a 23°C por 2 a 4 dias de co-cultivo.

Após um período de 2 a 4 dias de co-cultivo, os explantes foram cultivados primeiro em um meio sem dicamba (meio de retardo) por 3 a 5 dias antes de serem transferidos para o meio de seleção com dicamba. Até 10 serem transferidos do meio de retardo para o meio de seleção, os explantes foram mantidos no mesmo PLANTCON usado para o co-cultivo, mas 10 ou 12 ml do meio de retardo foram adicionados a cada PLANTCON. Alternativamente, os explantes foram transferidos para novos PLANTCONs, cada um contendo um pedaço de feltro autoclavado (Jo-Ann Fabrics & Crafts, Madison, WI) e 30 ml do meio de retardo. O meio de retardo continha meio de 15 plantas florestais modificado (Lloyd & McCown, 1981) (Lloyd & McCown, 1981) suplementado com 1 ou 5 mg/L de BAP (6-benzil Amino Purina), carbenicilina 200 mg/L (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS), cefotaxima 200 mg/L (Hospira, Lake Forest, IL) e ticarcilina 100 mg/L (Duchefa, Holanda). BAP pode ajudar a manter a proporção auxina-citocinina já 20 que dicamba é um herbicida de auxina, e promover produção de mudas múltiplas a partir do meristema apical. Outras citocininas adequadas que podem ser úteis na prática da presente invenção incluem: citocininas de adenina (por exemplo, cinetina, zeatina, benzil adenina (isto é, 6-benzil aminopurina), 25 adenina e citocininas de feniluréia (por exemplo, N,N'-difeniluréia) e Tidiazuron (TDZ).

A seleção foi conduzida em um meio líquido ou semisólido. O meio de seleção era o meio de retardo sem BAP e continha concentrações diferentes de dicamba. Para seleção em meio líquido, 50 ou 60 ml de meio 30 de seleção e um pedaço de esponja de espuma (Wisconsin Foam Products, Madison, WI) contendo 5 fendas paralelas foram colocados em cada Plantcon. Vinte e cinco explantes foram implantados nas fendas em uma posição

ascendente tal que o meristema apical direcionava-se para cima. A cada duas a três semanas, o meio antigo era substituído por meio fresco.

O meio semisólido foi preparado pela adição de AgarGel 4g/l (Sigma, St. Louis, MO) ao meio líquido. Para seleção em meio de seleção semisólido, ao explantes foram implantados individualmente no meio em PLANTCONs. No estágio tardio da seleção e desenvolvimento de mudas (aproximadamente 4 semanas no meio de seleção), 20 ml do meio de seleção líquido foram opcionalmente superpostos sobre o meio semisólido. Mudanças alongadas com folhas trifoliadas expandidas começaram a se desenvolver após os explantes terem sido cultivados em meio de seleção por cerca de 4 a 5 semanas. Essas mudas tolerantes foram destacadas dos explantes originais quando elas tinham cerca de e mais do que 2 cm de comprimento e transferidas para meio de indução de raiz líquido ou semisólido.

O meio para indução de raiz era igual ao do desenvolvimento de muda e também foi suplementado com dicamba para reduzir a frequência de escapes. Alternativamente, Bean Rooting Medium (BRM) suplementado com 0,01 mg/L de dicamba foi usado para indução de raiz. Esse meio continha ½ força de sais MS, vitaminas MS, inositol 100 mg/L, cisteína 100 mg/L, sacarose 30 mg/L e ticarcilina 100 mg/L e foi solidificado com 8 g/l de ágar lavado. Para indução da raiz no meio líquido, esferas de vidro bastante pequenas (Inotech Biosystems International Inc., Dottikon, Suíça) e 60 ml do meio de enraizamento foram colocadas em cada PLANTCON tal que o meio e as esferas estavam no mesmo nível. Até nove mudas destacadas foram inseridas nas esferas para indução de raiz em meio líquido ou em meio semisólido em cada PLANTCON. Quase todas as mudas puderam produzir raízes no meio de enraizamento em 1-2 semanas (FIGURA 5). Entretanto, apenas aquelas mudas nas quais as folhas existentes e novas permaneceram expandidas e cresceram vigorosamente foram transferidas para o solo para crescimento até a maturidade. Todas as culturas foram mantidas sob luz fluorescente com um fotoperíodo de 16 h com intensidade de luz de cerca de 20-70 μ E a 27-28°C até que as plantas R₀ foram transferidas para o solo.

Em um estudo, células de soja transformadas com pMON73691

foram selecionadas com 0,01 a 0,1 mg/L de dicamba em meio de seleção (FIGURA 1 A& B; FIGURA 4). As mudas que se originaram dos explantes cultivados em meio de seleção com 0,05 ou 0,1 mg/L de dicamba não tiveram muito crescimento e eventualmente mudas branqueadas e não tolerantes foram obtidas. Entretanto, em meio de seleção contendo 0,01 mg/L de dicamba, 30 mudas tolerantes a dicamba foram coletadas de 800 explantes. Doze dessas formaram raízes em meio de enraizamento e foram transferidas para o solo. Dez dessas foram testadas para polinucleotídeos que codificam DMO e sete foram encontradas serem positivas. Em um nível de dicamba de 0,02 mg/L, poucas mudas tolerantes foram colhidas. Esses resultados sugerem que uma concentração de 0,01 mg/L de dicamba ou menos foi a mais eficaz para selecionar mudas tolerantes a dicamba. Esse nível pode ser alterado de imediato pelo versado na técnica para estudos particulares, entretanto, que dependem da natureza do explante, construto e outras variáveis.

A fim de demonstrar a seleção de mudas tolerantes que contêm um gene ligado, um ácido nucleico que codifica DMA expressável em planta acoplado a um ácido nucleico que codifica GFP expressável em planta foi introduzido em células após a seleção. As culturas foram examinadas quanto a expressão de GFP 45 dias após a inoculação (DAI). Pequenos brotos positivos para GFP foram observados em vários explantes, sugerindo que esses brotos se originaram de células transformadas com a molécula de polinucleotídeo que codifica DMO ligada (FIGURA 2). Vários desses brotos desenvolveram mudas positivas para GFP e foram positivos para o gene de GFP (FIGs. 3, 6). Esses resultados demonstraram que uma molécula de polinucleotídeo que codifica DMO pode ser usada como um marcador selecionável e pode ser usada para a recuperação de transformantes que contem e expressam um gene ligado. A confirmação de que o transgene de GFP foi herdado pela progênie foi encontrada pela autopolinização de plantas R_0 transformadas com pMON73691. Sementes R_1 imaturas (cerca de 4 mm de comprimento) foram coletadas e cortadas em duas metades para expor o tecido do cotilédono. A expressão de GFP foi detectada no tecido de cotilé-

done de sementes sob um microscópio de dissecação equipado com luz fluorescente.

O enraizamento também foi obtido em Oasis Growing Medium, isto é, plugues (Smithers-Oasis North America, Kent, OH, USA). Um total de 102 mudas selecionadas com Dicamba foram inseridas em plugues de Oasis para indução de raízes. Os plugues foram circundados por um meio líquido contendo 0,01 mg/L de dicamba. As mudas nos plugues foram mantidas em ambiente de cultura a 28°C e 16 h de luz. Trinta mudas desenvolveram raízes e pareceram ser resistentes a dicamba mostrando folhas novas relativamente expandidas. As plantas com raízes foram testadas por ensaio invasor e 19 plantas foram encontradas conter ambos os genes DMO e GUS. A taxa de escape sobre meio líquido foi cerca de 33%, o que foi muito menor do que a taxa de escape de 53% quando as raízes foram induzidas em meio semisólido. Os fenótipos negativos das mudas, isto é, folhas encurvadas, puderam ser vistos mais cedo no meio de seleção líquido do que no meio semisólido. Isso sugere que o enraizamento no meio de seleção líquido pode ser um meio mais eficiente para eliminar escapes.

Exemplo 3

Análise molecular de plantas de soja transformadas

A fim de confirmar que as plantas tolerantes a dicamba obtidas foram o resultado de transferência de polinucleotídeos que codificam DMO, tecido de folha foi coletado de cada planta R₀ ou R₁, o DNA foi extraído e a presença de polinucleotídeo que codifica DMO foi confirmada pela tecnologia Invader™ (Third Wave Technologies, Madison, WI) e análise Southern blot usando um kit de sonda não-radioativa da Roche (Indianápolis, IN).

Para o ensaio Invader, os iniciadores usados foram: sonda primária 5'-acggacgcggag ATGCTCAACTTCATCGC-3' (SEQ ID NO: 13) e Invader oligo 5'-TCCGCTGGAACA AGGTGAGCGCGT-3' (SEQ ID NO: 14). A sequência em letras minúsculas na sonda primária é a sequência 5' flap que é clivada e não é complementar à sequência alvo.

Para a análise de Souther blot, um fragmento de DNA de 897 bp foi usado para preparar a sonda. O iniciador de sentido direto 5'-

GTCGCTGCCCTGCTTGATATT-3' (SEQ ID NO: 15) e o iniciador reverso 5'-CGCCGCTTCTAGTTGTTC-3' (SEQ ID NO: 16) foram usados para amplificar o fragmento de DNA de 897 bp. Um total de 12 mudas enraizadas selecionadas entre mudas com 0,01 mg/L de dicamba foi transferido para o solo.

- 5 Dez plantas foram ensaiadas por Invader e/ou análise Southern. Sete destas mostraram a presença de ácido nucleico codificando DMO (Tabela 3). Várias dessas também foram positivas para polinucleotídeos que codificam GFP, confirmando a habilidade em usar ácido nucleico que codifica DMO como um marcador selecionável para recuperação de transformantes que contêm
- 10 um gene ligado.

Tabela 3. Teste de plantas R0 para ácido nucleico que codifica DMO por Invader e/ou Análise Southern.

Nome da planta	Origem (Exp-Trt)	Invader	Southern
GM_A4755D	533-1	+	+
GM_A4756D	533-1	-	-
GM_A4757D	533-1	-	-
GM_A4758D	533-1	-	-
GM_A4763D	533-1	+	+
GM_A4759D	534-1	+	+
GM_A4760D	534-1	-	+
GM_A4761D	534-1	+	+
GM_A4764D	534-1	N/T	+
GM_A5087D	534-1	N/T	+

Exemplo 4

- Seleção de plantas tolerantes a dicamba transformadas com**
- 15 **variantes da molécula de polinucleotídeo que codifica DMO**

- Duas variantes da molécula de polinucleotídeo que codifica DMO foram usadas para obter plantas tolerantes a dicamba. A primeira variante tinha cisteína na posição do aminoácido 112 (DMOCys₁₁₂; pMON73698) e a segunda tinha triptofano na posição do aminoácido 112
- 20 (DMOTrp₁₁₂; pMON73696). A seleção usando ambas as variantes resultou em mudas tolerantes a dicamba (FIGURA 7). Após a seleção e indução de brotos e de raiz, as plantas enraizadas foram transferidas para o solo para o

crescimento até a maturidade e testadas por Invader™ e/ou análise Southern para a presença de ácido nucleico que codifica DMO. Várias plantas transformadas com pMON73696 foram encontradas serem positivas para o gene de DMO na geração R_0 e R_1 indicando transformação da linhagem germinativa usando o método da presente invenção.

5

Tabela 4. Seleção de brotos tolerantes a dicamba transformados com variantes de ácido nucleico que codifica DMO.

Meio	Construto	No. de Explan- tes	No. de brotos tolerantes cole- tados	No. de brotos enrai- zados transferidos para o solo	No. de plantas com gene DMO (No. de plantas testadas)
Líquido	73696 (DMOTrp ₁₁₂)	1022	6	1	0
	73698 (DMOCys ₁₁₂)	869	0	0	0
	73696 (DMOTrp ₁₁₂)	1200	25	9	3
	73698 (DMOCys ₁₁₂)	1200	0	0	0
Semisólido	73696 (DMOTrp ₁₁₂)	1536	94	50	28 (47)
	73698 (DMOCys ₁₁₂)	1845	3	0	0 (0)
	73696 (DMOTrp ₁₁₂)	450	27	18	10 (16)
	73698 (DMOCys ₁₁₂)	475	0	0	0 (0)

Exemplo 5

Seleção de plantas tolerantes à dicamba transformadas com moléculas de polinucleotídeos que codificam DMO combinadas com peptídeos de trânsito de cloroplasto diferentes

5 É sabido que peptídeos de trânsito em cloroplasto (CTPs) diferentes direcionam um polipeptídeo estranho aos cloroplastos com eficiências diferentes. O efeito de tipos diferentes de CTPs, portanto, foi testado pela transformação de explantes de soja com moléculas de polinucleotídeos que codificam DMO direcionadas tanto por CTP2 (pMON73691) quanto CTP1
10 (pMON73698) ou não direcionadas para cloroplastos (pMON73690). Como mostrado na Tabela 5, mudas em geral foram colhidas com construtos que contem tanto CTP2 quanto CTP1 (vide também FIGURA 7). As plantas enraizadas foram transferidas para o solo para crescimento até a maturidade e ensaiadas por Invader™ e/ou análise Southern para a presença de ácido
15 nucleico que codifica DMO. Diversas plantas transformadas com pMON73691 foram encontradas ser positivas para o gene de DMO na geração R₀ e R₁ indicando transformação da linhagem germinativa usando o método da presente invenção.

20 Várias plantas transgênicas carregando uma unidade de expressão PCISV/RbcS/DMO-Wdc/Nos ou PCISV/CTP2nat/DMO-Cnativo /Nos também foram descobertas serem tolerantes a um tratamento com dicamba na taxa de 1 lb/A (Clarity, BASF) em V3-4 quanto analisadas 18 DAT em um estudo em estufa.

Tabela 5. Seleção de plantas tolerantes a dicamba transformadas com ácido nucleico que codifica DMO combinado com diferentes peptídeos de trânsito em cloroplasto.

Exp-Trt	Construto	No. de Ex-plantas	No. de brotos tolerantes coletados	No. de brotos enraizados transferidos para o solo	No. de plantas com gene DMO (No. plantas testadas)
576-1	73691	1350	74	14	10 (14)
625-3	(CTP2/DMOCys ₁₁₂)	500	17	6	4 (5)
576-2	73691	1050	22	1	1 (1)
625-1	(CTP2/DMOCys ₁₁₂)	531	1	0	0
625-2	73698	531	2	0	0
	(CTP1/DMOCys ₁₁₂)				
	73690 (DMOCys ₁₁₂)				
	73690 (DMOCys ₁₁₂)				

Exemplo 6

Uso de molécula de polinucleotídeos que codifica DMO como um marcador selecionável em combinação com um gene de característica agronômica

- 5 Um uso benéfico de uma molécula de polinucleotídeo que codifica DMO como um marcador selecionável é a recuperação de transformantes que contêm um gene ligado geneticamente, por exemplo, que confere uma característica agronômica melhorada. Essa habilidade foi demonstrada pela transformação de explantes de soja com pMON58498 tendo 2 DNAs: um
- 10 primeiro T-DNA que tem uma molécula de polinucleotídeo que codifica DMO e um segundo T-DNA que tem um gene de CP4 para tolerância ao glifosato. Plantas transgênicas selecionadas em meio semisólido foram transferidas para o solo e testadas por Invader™ e/ou análise Southern para mostrar a presença de ácidos nucleicos de DMO e CP4.
- 15 Apesar de ambas as moléculas de polinucleotídeo que codificam DMO e CP4 poderem ser usadas como um marcador selecionável, foi mostrado que os transformantes que compreendem um transgene de CP4 poderiam ser selecionados usando apenas seleção com dicamba. Como mostrado na Tabela 6, todas menos uma planta regenerada de cada um dos
- 20 dois tratamentos tinha ambos os genes de DMO e CP4. Esse estudo demonstra, portanto, a habilidade em usar DMO como marcador selecionável para a recuperação de genes agronômicos. Entende-se que qualquer gene ligado que está geneticamente ligado a um marcador selecionável de DMO como introduzido em um genoma, por exemplo, presente dentro de 50 cM,
- 25 pode ser selecionado dessa maneira e que tais genes não precisam necessariamente ser introduzidos no mesmo vetor.

Tabela 6 . Uso de DMO como um marcador selecionável em combinação com um gene de característica agronômica.

Exp-Trt	BAP em meio de retardo (mg/L)	No. de Explan-tes	No. de Brotos toleran-tes coletados	No. de Brotos enraiza-dos no solo	No. de plantas com gene DMO (No. de plantas tes-tadas)	No. de plantas com o gene CP4 (No. de plan-tas testadas)
566-1 & 567-1	1	1654	51	37	19 (37)	18 (37)
566-2 & 567-2	5	1800	35	11	3 (11)	2 (11)

Exemplo 7

Tolerância de plantas que contem molécula de polinucleotídeo que codifica DMO a outros herbicidas similares à auxina

Uma análise foi realizada para determinar se plantas de soja
 5 que tem polinucleotídeo que codifica DMO poderiam desativar outros herbicidas similares à auxina além de dicamba. Isso foi realizado pela aplicação de várias concentrações de formulações comercialmente disponíveis de outros herbicidas similares à auxina tais como 2,4-D (Helena, Collierville, TN), MCPA (Agrilience, St. Paul, MN), triclopir (GARLON 3A; Dow Elanco, Indianápolis,
 10 IN), clopiralid (STINGER; Dow Elanco, Indianápolis, IN), picloram (TORDON 22K; Dow Elanco, Indianápolis, IN), ou Banvel ou Clarity (BASF, Raleigh, NC) em tecidos ou plantas que contem DMO.

Plantas de soja transgênica foram obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium* de explantes de soja com um polinucleotídeo
 15 que codifica DMO como descrito acima para os eventos designados Eventos 1-4. Uma linhagem não-transgênica foi usada como controle. Sementes não-transgênicas e transgênicas de soja foram plantadas em vasos de plástico de 79 cm² (3,5 polegadas quadradas) contendo Redi-earth™ (Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio). Os vasos foram colocados sobre
 20 uma esteira capilar em bandejas de irrigação de fibra de vidro de 889 mm x 1524 mm (35 polegadas x 60 polegadas) para irrigação superior e/ou subirrigação pela duração do período de teste a fim de manter a umidade otimizada do solo para o crescimento da planta. Os vasos foram fertilizados com Osmocote (14-14-14 de liberação lenta; Scotts-Sierra Horticultural Products
 25 Co., Marysville, Ohio) na taxa de 100 gm/cu.ft para manter o crescimento da planta durante a duração dos testes em estufa. As plantas cresceram em estufas em 27°/21° de temperatura de dia/noite, com umidade relativa entre 25%-75% para simular as condições de crescimento de estação quente do final da primavera. Um fotoperíodo mínimo de 14 h foi providenciado com
 30 iluminação suplementar em cerca de 600 µE como necessário.

Todas as aplicações de herbicida foram feitas com pulverizador usando bocal arejador plano Teejet 9501E (Spraying Systems Co, Wheaton,

IL) com ajuste de pressão de ar mínimo de 24 psi (165kpa). O bocal do pulverizador foi mantido a uma distância de cerca de 406,4 mm (16 polegadas) acima do topo do material de planta para pulverização. O volume pulverizado foi de 10 galões por acre ou 93 litros por hectare. As aplicações foram feitas quando as plantas atingiram o estágio V-3. Todos os testes foram estabelecidos em uma estrutura em bloco randomizada (randomizada por taxa) com 4 a 6 aplicações de cada tratamento dependendo da qualidade da planta, da disponibilidade e levando em consideração qualquer variabilidade ambiental que pudesse ter ocorrido dentro dos limites de cada estufa.

Todas as plantas tratadas nos testes em estufa foram avaliadas visualmente em cerca de 4, 14, 18 e 21 dias após o tratamento (DAT) quanto à injúria em uma escala de 0 a 100 por cento em relação a plantas de controle não tratadas, com zero representando "nenhuma" injúria e 100% representando injúria "completa" ou morte. Os dados foram coletados usando um computador palm top e analisados usando métodos estatísticos padronizados. Os resultados mostrados na Tabela 9 indicam claramente tolerância de soja transgênica a outros herbicidas similares à auxina tais como 2,4-D e MCPA em relação a linhagem não-transgênica.

Tabela 7. Percentual de injúria em relação aos controles não tratados em aplicações 25 DAT pos-V3 de diferentes herbicidas similares à auxina para plantas de soja não-transgênica ou transgênica. *

Herbicida	Planta/teste	% injúria nas taxas mostradas (g ae/ha**) em 21 DAT					
		280	561	1120			
Dicamba (Clarity)							
	Não-transgênica		100		100		
	Evento 1		0,0		1,2		
	Evento 2		0,0		1,7		
	Evento 3		0,0		0,7		
	Evento 4		0,0		1,5		
Dicamba (Banvel)							
	Não-transgênica		100,0		100,0		
	Evento 1		0,0		1,5		
	Evento 2		0,0		0,7		
	Evento 3		0,0		0,5		
	Evento 4		0,0		1,3		

2,4-D							
	Não-transgênica	86,8		100,0		100,0	
	Evento 1	58,3		75,0		100,0	
	Evento 2	64,2		94,7		100,0	
	Evento 3	40,0		85,0		100,0	
	Evento 4	45,8		84,2		100,0	
MCPA							
	Não-transgênica	93,0		98,3		100,0	
	Evento 1	72,5		99,3		100,0	
	Evento 2	55,0		95,0		99,7	
	Evento 3	55,0		95,8		100,0	
	Evento 4	88,3		98,8		100,0	
	LSD	16,3		10,6		3,7	
		% injúria nas taxas mostradas (g ae/ha**) em 14 DAT					
Triclopir							
	Não-transgênica	86,7		97,3		98,7	
	Evento 1	88,3		95,7		99,3	
	Evento 2	86,7		98,7		99,3	
	Evento 3	86,7		94,0		96,3	
	Evento 4	90,8		98,0		99,2	
Clopiralid							
	Não-transgênica	99,3		100,0		100,0	
	Evento 1	99,2		100,0		100,0	
	Evento 2	98,2		99,7		100,0	
	Evento 3	99,3		100,0		100,0	
	Evento 4	99,7		100,0		100,0	
Picloram							
	Não-transgênica	99,3		100,0		100,0	
	Evento 1	99,7		100,0		100,0	
	Evento 2	99,3		100,0		100,0	
	Evento 3	99,3		99,7		100,0	
	Evento 4	99,3		100,0		100,0	
	LSD	2,9		1,8		1,4	

* O % de injúria foi representado como médias de comparação de ANOVA. **gramas de equivalente de ácido ativo/hectare

Esse exemplo mostra que plantas de soja transgênica exibem tolerância a outros herbicidas similares à auxina, indicando um mecanismo de

desativação provavelmente comum para dicamba e outros herbicidas similares à auxina tais como 2,4-D e MCPA. No caso de triclopir, clopiralid e picloram, a taxa de aplicação de 280 g ae/ha pareceu muito estridente nesse estudo e assim, concentrações menores podem ser desejáveis na maioria dos ambientes para reduzir o dano da planta. Os resultados indicam que herbicidas similares à auxina podem ser usados para selecionar células de planta transformadas com moléculas de polinucleotídeo que codifica DMO, especialmente no caso de plantas que são muito sensíveis a dicamba, por exemplo, algodão. A concentração apropriada de herbicidas similares à auxina para seleção sob um dado grupo de condições pode ser otimizada usando uma grade de teste de tratamentos seguida pela observação de tecidos de planta tratados. Um exemplo de tal grade analisa o efeito de concentrações entre de cerca de 0,001 mg/L a cerca de 10 mg/L, incluindo 0,01, 0,1, 1,0, 2,0, e 5,0 mg/L.

Outro herbicida similar à auxina Butyrac 200 (2,4-DB; Albaugh) também foi testado em plantas de soja transgênica que carrega um gene de DMO para testar a tolerância de plantas a ele. O herbicida foi aplicado em um tratamento após a emergência em três taxas de aplicação sobre dois eventos de soja transgênica e comparado com uma linhagem não-transgênica para dano total da cultura através de todas as três taxas de aplicação: 280 g/ha (0,25 lb/a), 561g/ha (0,5 lb/a) e 841 g/ha (0,75 lb/a) (vide Tabela 8). Ambas as linhagens de soja transgênica mostraram um baixo nível de tolerância a 2,4-DB. Esse exemplo demonstra que soja tolerante a dicamba também é tolerante a níveis baixos de 2,4-DB e poderá ser útil no manuseio de danos de pulverização aérea dos próprios campos ou da vizinhança para prevenir perdas de cultura e poderá exibir tolerância a níveis residuais de 2,4-DB que acompanham a lavagem incompleta do equipamento de liberação de herbicida.

Tabela 8. Percentual de injúria em relação ao controle não tratado em 16 DAT pela aplicação de 2,4 -DB a plantas de soja não-transgênica ou transgênica.

Herbicida	Planta	% injúria nas taxas mostradas (g ae/ha**) em 16 DAT		
		280	561	1120
2, 4-DB (Butyrac 200)				
	Não-transgênica NE3001	59,2	70,0	79,2
	462-1-21	25,0	43,3	75,8
	469-13-19	18,3	37,5	70,0

Exemplo 8

5 **Uso de gene de DMO como um marcador selecionável contra outros herbicidas similares à auxina**

Explantos de soja recentemente isolados (eixo de embrião maduro sem cotilédones) foram inoculados com *Agrobacterium* cepa ABI abrindo pMON73691 (que contem os genes de DMO e GFP). Após 3 dias de co-cultura com *Agrobacterium* a 23°C e um fotoperíodo de 16 h de luminosidade e 8 h de escuro, os explantes foram cultivados em um meio de retardo líquido que continha meio de planta silvestre modificado suplementado com BAP 5 mg/L, carbenicilina 200 mg/L, cefotaxima 200 mg/L e ticarcilina 100 mg/L. Os explantes ficaram em meio de retardo por 4 dias. Eles foram então transferidos para meio de seleção líquido em PLANTCONs. O meio de seleção era igual ao meio de retardo exceto pela adição de vários níveis de 2,4-D (0,01, 0,1, 1,0 ou 2,0mg/L) ou 0,01 mg/L de dicamba como mostrado na Tabela 9 abaixo. Cada PLANTCON continha 60 ml do meio de seleção e um pedaço de esponja de espuma com 5 fendas. Vinte e cinco explantes foram igualmente inseridos nas fendas. As culturas foram mantidas a 28°C e um foto-período de 16 h de luminosidade e 8 h de escuro e foram examinadas periodicamente sob um microscópio estéril equipado para detectar tecidos que expressam GFP. 48 dias após a inoculação (DAI), botões ou brotos jovens expressando GFP (GFP+) foram observados nos vários dos explantes nos tratamentos com 0,01mg/L de dicamba, 0,01, 0,1 ou 1,0mg/L de 2,4-D,

- mas não nos explantes tratados com 2 mg/L de 2,4-D. O desenvolvimento extenso de calos foi observado sobre os explantes nos tratamentos com 1 ou 2 mg/L de 2,4-D. No tratamento com 0,01 ou 0,1 mg/L de 2,4-D, os explantes tiveram crescimento extenso de brotos e poucos tiveram brotos alongados GFP+.

Tabela 9. Sumário de experimento usando DMO como um marcador selecionável e 2,4-D como o agente seletivo.

Tratamento No.	Agente seletivo e concentração	No. de Explantes inoculados	No. de Explantes w/ GFP+ botões/brotos jovens 48DAI
710-1	0,01mg/L de dicamba (controle)	375	28
710-2	0,01mg/L de 2,4-D	375	33
710-3	0,1mg/L de 2,4-D	375	19
710-4	1mg/L de 2,4-D	375	4
710-5	2mg/L de 2,4-D	375	0

Exemplo 9

- Seleção de plantas tolerantes a dicamba transformadas com polinucleotídeo que codifica DMO sem a etapa de retardo**

- Plantas transgênicas com um gene de DMO sem a etapa de retardo para seleção foram produzidas em três estudos. Como um exemplo, os explantes foram infectados e co-cultivados com *Agrobacterium* carregando pMON73696. Após o período de co-cultura, os explantes foram cultivados em meio líquido contendo 5 mg/L de BAP e 0,01 mg/L de dicamba por 4 dias e então transferidos para o meio de seleção líquido ou semisólido com 0,01 mg/L de dicamba. Como mostrado na Tabela 10, brotos tolerantes a dicamba puderam ser obtidos a partir de tratamentos (717-2 e 757-2) que utilizaram seleção imediatamente após co-cultura com *Agrobacterium*.

Tabela 10. Seleção de plantas tolerantes a dicamba transformadas com polinucleotídeo que codifica DMO sem a etapa de retardo

Tratamento Experimental	Número de dias atrasados para a seleção	Construto (pMON)	No. de Explan-tes	No. de Plantas transferi-das para o solo	No. de Plantas testadas com In-vader	No. de Plantas com o gene
717-1	4	73696	608	15	15	4
717-2	0	73696	665	14	12	6
757-1	4	73696	542	13	11	6
757-2	0	73696	542	7	7	7

Exemplo 10

5 **Uso de DMO como um marcador selecionável para *Arabi-* *dopsis***

A suscetibilidade de *Arabidopsis* a diferentes níveis de dicamba foi inicialmente testada. Sementes de *Arabidopsis* var. Columbia selvagem foram plaqueadas sobre meio de cultura de tecido de planta contendo várias quantidades de dicamba. A FIGURA 8 mostra que *Arabidopsis* selvagem foi totalmente suscetível a 1,0 mg/L no meio de cultura. Plantas de *Arabidopsis* foram então transformadas com os construtos que contem polinucleotídeos de DMO usando o método de imersão floral (Clough and Bent, 1998). Sementes R₁ foram plaqueadas sobre o meio de cultura contendo até 4 mg/L de dicamba. FIGURA 9, por exemplo, mostra recuperação de plantas tole-
rantes a dicamba (mostradas por setas) após a transformação com pMON 73696. Essas plantas tolerantes a dicamba foram encontradas conter uma ou mais cópias de nucleotídeo de DMO como determinado pelo teste Inva-
der™. O exemplo demonstrou a utilidade do gene de DMO na produção de plantas tolerantes a dicamba de outras espécies de planta.

* * * * *

Todas as composições e/ou métodos descritos e reivindicados neste documento podem ser feitos e executados sem experimentação exaustiva tendo em vista a presente descrição. Embora as composições e métodos dessa invenção tenham sido descritos em termos de modalidades

preferidas, ficará claro para aqueles versados na técnica que variações podem ser aplicadas às composições e/ou métodos e em todas as etapas ou na sequência de etapas do método descrito neste documento sem se afastar do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, ficará claro que certos agentes que são quimicamente e fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes descritos neste documento embora resultados iguais ou similares possam ser obtidos. Todos os tais substitutos similares e modificações claras para o versado na técnica são considerados estar dentro do espírito, escopo e conceito da invenção conforme definido pelas reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

As referências listadas abaixo estão incorporadas neste documento por referência à medida que elas suplementam, explicam, fornecem um antecedente ou ensinam metodologia, técnicas e/ou composições empregadas neste documento.

Patente U. S. 4.554.101; Patente U.S. 4.940.838; Patente U.S. 5.017.692; Patente U.S. 5.229.114; Patente U.S. 5.302.523; Patente U.S. 5.304.730; Patente U.S. 5.322.938; Patente U.S. 5.352.605; Patente U.S. 5.359.142; Patente U.S. 5.362.865; Patente U.S. 5.384.253; Patente U.S. 5.445.962; Patente U.S. 5.463.175; Patente U.S. 5.464.763; Patente U.S. 5.464.765; Patente U.S. 5.491.084; Patente U.S. 5.512.466; Patente U.S. 5.516.671; Patente U.S. 5.530.196; Patente U.S. 5.538.877; Patente U.S. 5.538.880; Patente U.S. 5.543.576; Patente U.S. 5.545.818; Patente U.S. 5.550.318; Patente U.S. 5.552.299; Patente U.S. 5.563.055; Patente U.S. 5.567.600; Patente U.S. 5.567.862; Patente U.S. 5.591.616; Patente U.S. 5.608.149; Patente U.S. 5.633.435; Patente U.S. 5.641.876; Patente U.S. 5.659.122; Patente U.S. 5.689.041; Patente U.S. 5.689.052; Patente U.S. 5.716.837; Patente U.S. 5.750.876; Patente U.S. 5.763.241; Patente U.S. 5.763.245; Patente U.S. 5.773.696; Patente U.S. 5.804.425; Patente U.S. 5.837.848; Patente U.S. 5.850.019; Patente U.S. 5.850.023; Patente U.S. 5.866.775; Patente U.S. 5.869.720; Patente U.S. 5.880.275; Patente U.S. 5.942.658; Patente U.S. 5.942.664; Patente U.S. 5.958.745; Patente U.S.

5.959.091; Patente U.S. 5.981.834; Patente U.S. 5.985.605; Patente U.S.
 5.998.700; Patente U.S. 6.011.199; Patente U.S. 6.013.864; Patente U.S.
 6.015.940; Patente U.S. 6.023.013; Patente U.S. 6.051.753; Patente U.S.
 6.063.597; Patente U.S. 6.063.756; Patente U.S. 6.072.103; Patente U.S.
 5 6.080.560; Patente U.S. 6.093.695; Patente U.S. 6.107.549; Patente U.S.
 6.110.464; Patente U.S. 6.121.436; Patente U.S. 6.140.075; Patente U.S.
 6.140.078; Patente U.S. 6.146.826; Patente U.S. 6.153.814; Patente U.S.
 6.156.573; Patente U.S. 6.166.292; Patente U.S. 6.171.640; Patente U.S.
 6.175.060; Patente U.S. 6.177.611; Patente U.S. 6.177.615; Patente U.S.
 10 6.215.048; Patente U.S. 6.221.649; Patente U.S. 6.222.098; Patente U.S.
 6.225.114; Patente U.S. 6.228.623; Patente U.S. 6.228.992; Patente U.S.
 6.232.526; Patente U.S. 6.235.971; Patente U.S. 6.242.241; Patente U.S.
 6.248.536; Patente U.S. 6.248.876; Patente U.S. 6.252.138; Patente U.S.
 6.271.443; Patente U.S. 6.281.016; Patente U.S. 6.284.949; Patente U.S.
 15 6.294.714; Patente U.S. 6.313.378; Patente U.S. 6.316.407; Patente U.S.
 6.326.351; Patente U.S. 6.372.211; Patente U.S. 6.380.462; Patente U.S.
 6.380.466; Patente U.S. 6.399.330; Patente U.S. 6.423.828; Patente U.S.
 6.426.446; Patente U.S. 6.426.447; Patente U.S. 6.429.357; Patente U.S.
 6.429.362; Patente U.S. 6.433.252; Patente U.S. 6.437.217; Patente U.S.
 20 6.441.277; Patente U.S. 6.444.876; Patente U.S. 6.448.476; Patente U.S.
 6.459.018; Patente U.S. 6.468.523; Patente U.S. 6.476.295; Patente U.S.
 6.483.008; Patente U.S. 6.489.461; Patente U.S. 6.495.739; Patente U.S.
 6.501.009; Patente U.S. 6.506.962; Patente U.S. 6.518.488; Patente U.S.
 6.521.442; Patente U.S. 6.531.648; Patente U.S. 6.537.750; Patente U.S.
 25 6.537.756; Patente U.S. 6.538.109; Patente U.S. 6.538.178; Patente U.S.
 6.538.179; Patente U.S. 6.538.181; Patente U.S. 6.541.259; Patente U.S.
 6.555.655; Patente U.S. 6.573.361; Patente U.S. 6.576.818; Patente U.S.
 6.589.767; Patente U.S. 6.593.293; Patente U.S. 6.596.538; Patente U.S.
 6.608.241; Patente U.S. 6.617.496; Patente U.S. 6.620.988; Patente U.S.
 30 6.635.806; Patente U.S. 6.639.054; Patente U.S. 6.642.030; Patente U.S.
 6.645.497; Patente U.S. 6.653.280; Patente U.S. 6.653.530; Patente U.S.
 6.657.046; Patente U.S. 6.660.849; Patente U.S. 6.663.906; Patente U.S.

- 6.686.452; Patente U.S. 6.706.950; Patente U.S. 6.713.063; Patente U.S. 6.716.474; Patente U.S. 6.723.837; Patente U.S. 6.723.897; Patente U.S. 6.770.465; Patente U.S. 6.774.283; Patente U.S. 6.803.501; Patente U.S. 6.809.078; Patente U.S. 6.812.379; Patente U.S. 6.822.141; Patente U.S. 6.828.475
- 5 Pedido Provisório U.S. No. de Série 60/891.675
- Publicação de Patente U.S. 2005/0005321; Publicação de Patente U.S. 2003/0115626; Publicação de Patente U.S. 2003/01403641; Publicação de Patente U.S. 2003/0135879; Publicação de Patente U.S. 2003/0028917
- 10 Pedido de Patente U.S. No. de Série 09/757.089; Pedido de Patente U.S. No. de Série 11/749.583
- Patente U.S. USRE37.543
- Patente U.S. USRE38.446
- 15 Becker *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 20:49, 1992.
- Bevan *et al.*, *NAR*, 11: 369, 1983.
- Broothaerts *et al.*, *Nature*, 433: 629-633, 2005.
- Carrington & Freed, *J. Virology*, 64:1590, 1990.
- Chalfie *et al.*, *Science*, 263:802, 1994.
- 20 Chandler *et al.*, *Plant Cell*, 1:1175-1183, 1989.
- Charest *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 8:643, 1990.
- Chu *et al.*, *Scientia Sinica*, 18:659, 1975.
- Clough & Bent, *Plant J.*, 16:735, 1998.
- Comai *et al.*, *Nature*, 317:741, 1985.
- 25 Cork & Khalil, *Adv. Appl. Microbiol.*, 40: 289, 1995.
- Cork & Krueger, *Adv. Appl. Microbiol.*, 38:1, 1991.
- Coruzzi *et al.*, *EMBO J.*, 3: 1671, 1984.
- Creissen *et al.*, *Plant J.*, 2:129, 1991.
- Crop Protection Reference, Chemical & Pharmaceutical Press, Inc., NY, 11^a Ed., 1803-1821, 1995
- 30 De Block *et al.*, *EMBO J.*, 3:1681, 1984.
- De Block *et al.*, *EMBO J.*, 6:2513, 1987.

- della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6873-6877, 1986.
- Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 561, 1982.
- Duncan *et al.*, *Planta*, 165:322, 1985.
- 5 Ebert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5745-5749, 1987.
- Eckes *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 205:14, 1986.
- Eichholtz *et al.*, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 13:67, 1987.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4803, 1983.
- Gamborg *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 50:151, 1968.
- 10 Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell*, 2:603, 1990.
- Haseloff *et al.*, *TIG*, 11:328-329, 1995.
- Hayford *et al.*, *Plant Physiol.*, 86:1216, 1988.
- Hille *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 7:171, 1986.
- Horsch *et al.*, *Science*, 227:1229, 1985.
- 15 Ingelbrecht *et al.*, *Plant Cell*, 1:671, 1989.
- Jefferson, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5:387, 1987.
- Jones *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 210:86, 1987.
- Kado, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 10:1, 1991.
- Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 210:437-442, 1987.
- 20 Koncz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:131, 1987.
- Krueger *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 37:534, 1989.
- Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lawton *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 9:315-324, 1987.
- Linsmaier & Skoog, *Physio. Plant*, 18:100, 1965.
- 25 Lloyd & McCown, *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30:421, 1981.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.
- McCown & Lloyd, *Hort. Science*, 16:453, 1981.
- Miki *et al.*, In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick and Thompson (Eds.), CRC Press, 67-88, 1993.
- 30 Moloney *et al.*, *Plant Cell Reports*, 8:238, 1989.
- Murashige and Skoog, *Physiol. Plant*, 15:473-497, 1962.

- Nitsch & Nitsch, *Science*, 163:85, 1969.
- Odell *et al.*, *Nature*, 313:810-812, 1985.
- Pedido EP. 553494
- Pedido EP. 646643
- 5 Pedido PCT. WO 97/11086
- Pedido PCT. WO 95/24492
- Pedido PCT. WO 97/31115
- Pedido PCT. WO 97/41228
- Rojiyaa *et al.*, 1987 (JP 1987201527-A), GenBank Accession
- 10 E01312.
- Sambrook *et al.*, *In: Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Schenk & Hildebrandt, *Can. J. Bot.*, 50:199, 1972.
- Shah *et al.*, *Science*, 233:478, 1986.
- 15 Southern, *Mol. Biol.*, 98:503, 1975.
- Stalker *et al.*, *Science*, 242:419, 1988.
- Streber & Willmitzer, *Bio/Technology*, 7:811, 1989.
- Svab *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 14:197, 1990.
- Teeri *et al.*, *EMBO J.*, 8:343, 1989.
- 20 Turner & Foster, *Molec. Biotechn.*, 3:225, 1995.
- Uchimiya & Murashige, *Plant Physiol.*, 15:473, 1962.
- Vanden Elzen *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 5:299, 1985.
- Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6624-6628, 1987.
- Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para selecionar uma célula de planta transformada, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 a) colocar uma população de células de planta que compreende uma célula de planta transgênica transformada em contato com um polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase com um meio que compreende um herbicida dicamba em uma quantidade que inibe o crescimento de células da população que não tem o polinucleotídeo, em que o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada de: (1)
10 uma sequência de ácido nucleico compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 7, e (2) sequências de nucleotídeos degeneradas da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos; e

b) selecionar a célula de planta transformada da população de células de planta baseado na tolerância exibida pela célula transformada ao
15 herbicida dicamba.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a população de células de planta em um meio sem herbicida dicamba antes da etapa a) e/ou entre a etapa a) e etapa b).

20 3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o meio sem o herbicida dicamba contém uma citocina.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o meio sem herbicida dicamba contém 6-benzil amino purina (BAP).

25 5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a 6-benzil amino purina está em uma concentração de cerca de 10 mg/L de meio ou menos.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase não está geneticamente ligado a um gene marcador selecionável ou rastreável diferente de dicamba mono-oxigenase.
30

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que compreende ainda a etapa de (d) regenerar uma planta transgênica fértil a partir da célula de planta transformada.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula de planta transformada é de uma planta dicotiledônea ou monocotiledônea.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a planta dicotiledônea é selecionada do grupo que consiste em alfafa, feijões, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, algodão, pepino, berinjela, alface, melão, ervilha, pimenta, abóbora, rabanete, colza, espinafre, soja, abóbora, tomate e melancia.

10. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a planta monocotiledônea é selecionada do grupo que consiste em milho, cebola, arroz, sorgo, trigo, centeio, painço, cana de açúcar, aveia, triticales, switchgrass e turfgrass.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica dicamba mono-oxigenase está operativamente ligado a um peptídeo de trânsito de cloroplasto.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dicamba está contido no meio em uma concentração de cerca de 0,001 mg/L a cerca de 10,0 mg/L.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a população de células compreende um explante de cotilédone.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a célula de planta transformada é preparada por transformação mediada por *Agrobacterium*.

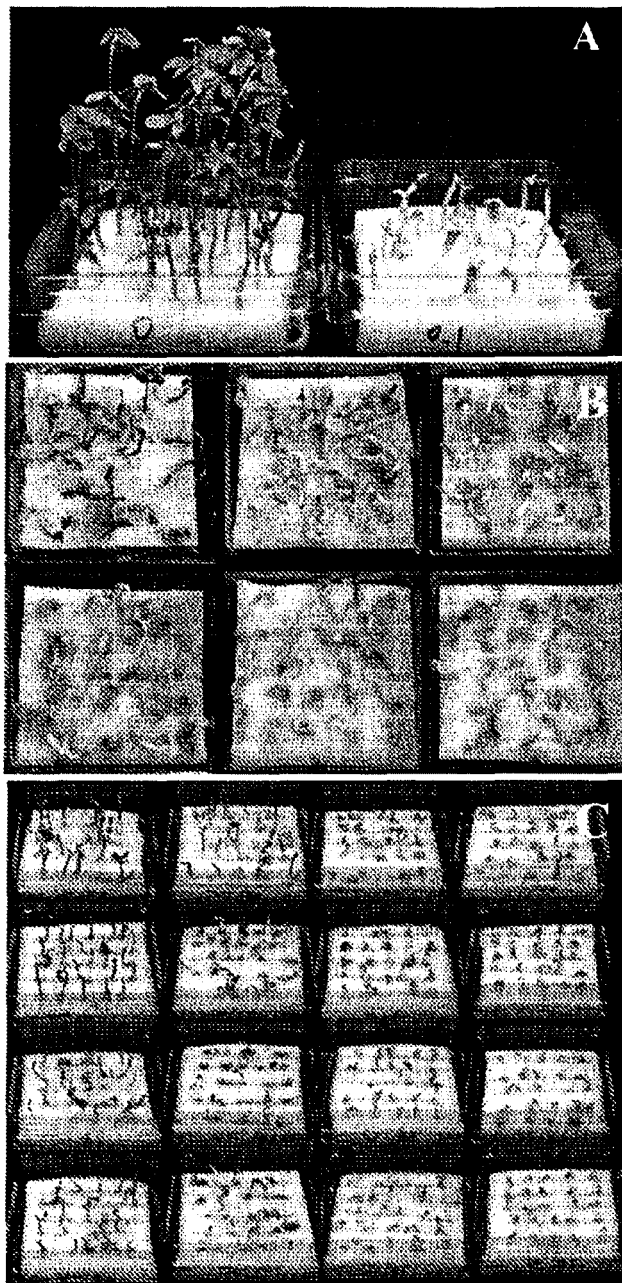


FIG. 1

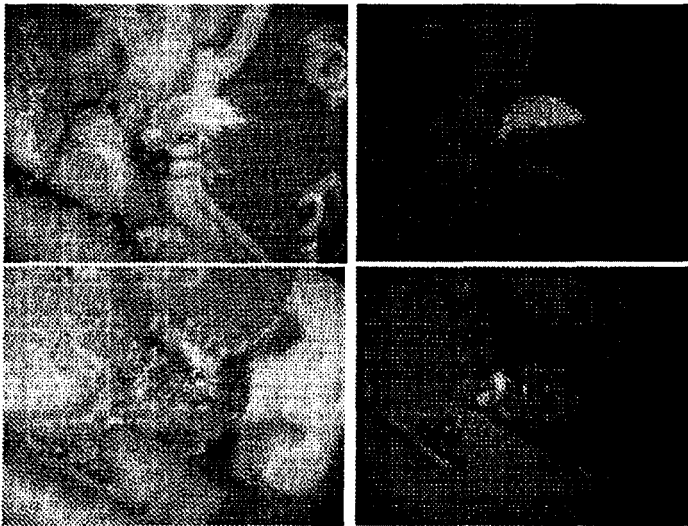


FIG. 2

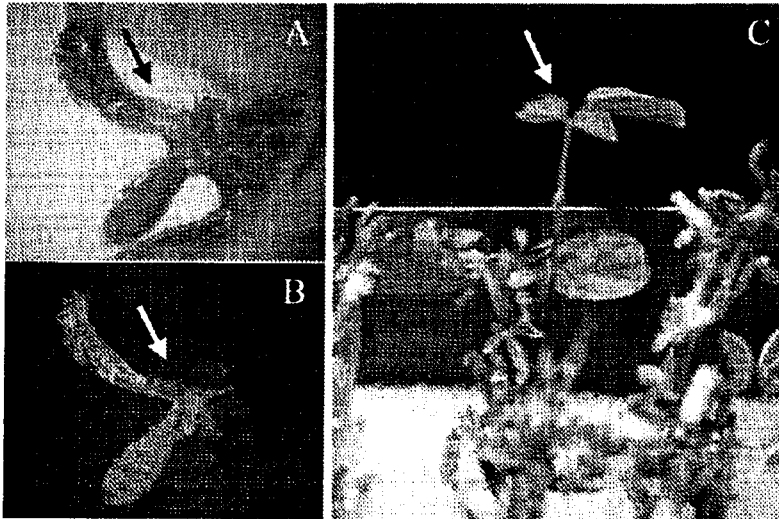


FIG. 3



FIG. 4

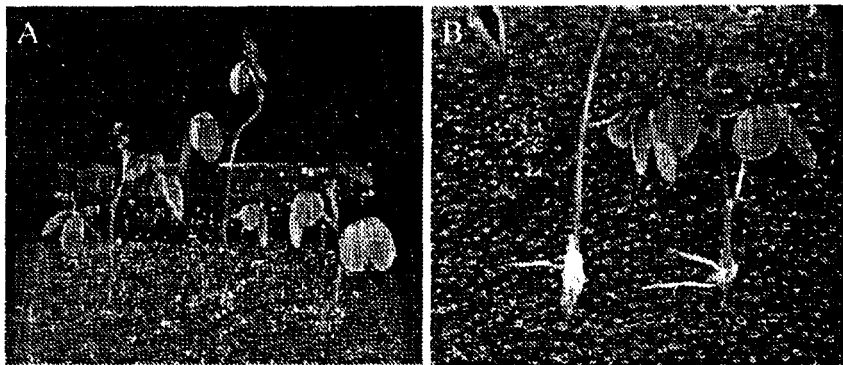


FIG. 5

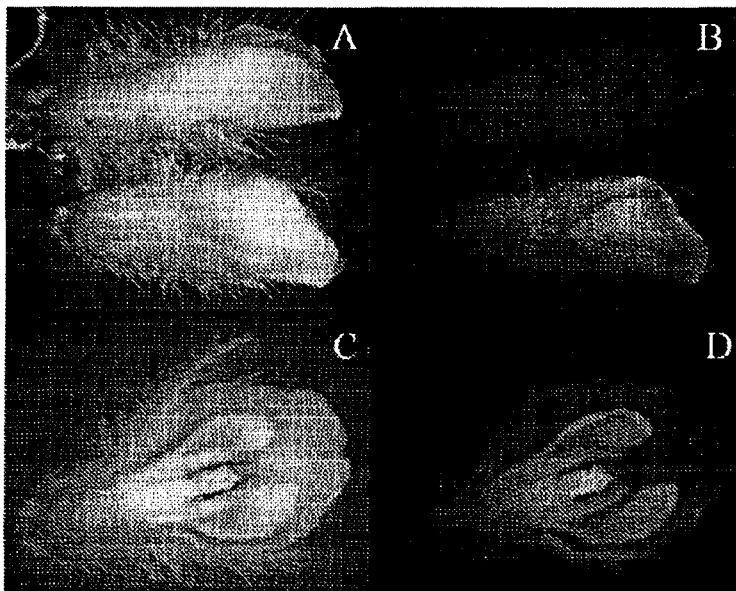


FIG. 6

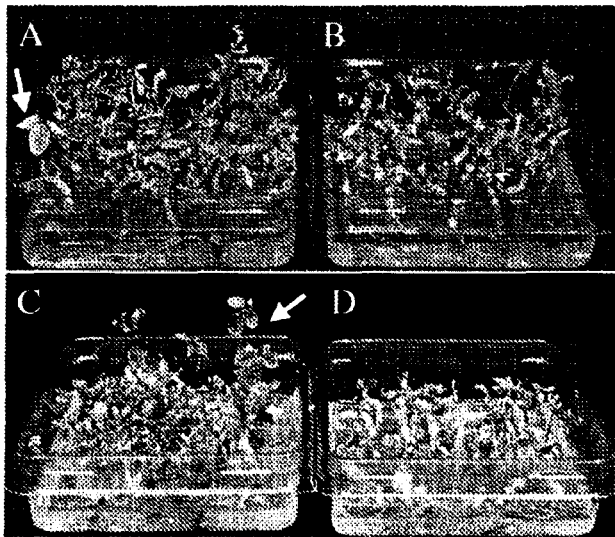
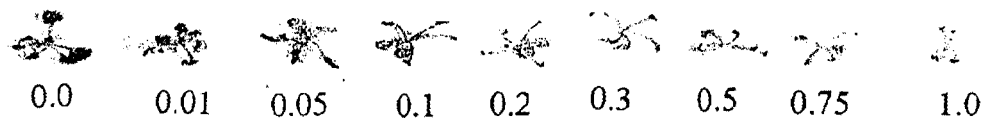


FIG. 7

**FIG. 8**

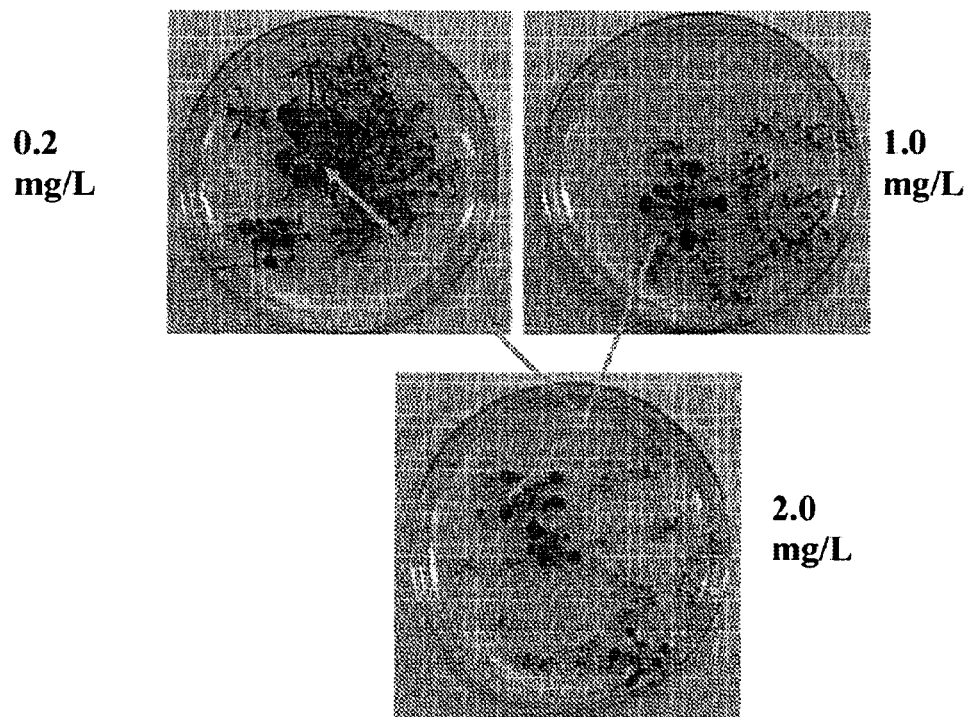


FIG. 9