



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

(21) **PI0615680-0 A2**

(22) Data de Depósito: 06/09/2006
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82 2006.01
A01H 5/00 2006.01

(54) Título: **VETORES E MÉTODOS PARA A EFICIÊNCIA APERFEIÇOADA DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS**

(30) Prioridade Unionista: 06/09/2005 US 60/714,501

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): LARRY A. GILBERTSON, MICHAEL W. PETERSON, XUDONG YE

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006034503 de 06/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/030432 de 15/03/2007

(57) Resumo: VETORES E MÉTODOS PARA A EFICIÊNCIA APERFEIÇOADA DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS Proporcionam-se métodos e composições para a transformação aperfeiçoada de plantas mediada por bactéria. Os métodos geralmente permitem a transformação das plantas com integração reduzida da cadeia principal do vetor e uma frequência alta de ocorrências de transformação com poucas cópias. Vetores são descritos para obter estes resultados, como são os métodos para o seu uso.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "VETORES E MÉTODOS PARA A EFICIÊNCIA APERFEIÇOADA DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5 Este pedido reivindica a prioridade do pedido provisório U.S. Nº de Série 60/714.501, depositado em 6 de setembro de 2005, cujos conteúdos inteiros são incorporados por referência neste documento.

1. Campo da Invenção

10 A presente invenção refere-se, em geral, ao campo da biologia molecular. Mais especificamente, a invenção refere-se a métodos aperfeiçoados para a transformação genética de plantas e composições para atingir isto.

2. Descrição da Técnica Relacionada

15 A transformação de células de plantas por um método mediado por *Agrobacterium* envolve a exposição das células e tecidos de plantas a uma suspensão de células de *Agrobacterium* que contêm certos plasmídios de DNA. Estes plasmídios têm sido construídos especificamente para conter transgenes que expressarão nas células de plantas (vide, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.034.322). Mais freqüentemente, um ou mais dos transgenes são um transgene marcador selecionável positivo que permite que as células de plantas desenvolvam-se na presença de um composto de seleção positivo, tal como um antibiótico ou herbicida. Estas células podem ser adicionalmente manipuladas para regenerar em plantas férteis inteiras.

25 Os métodos para introduzir os transgenes nas plantas por um método de transformação mediada por *Agrobacterium* geralmente envolvem um T-DNA (DNA de transferência) que incorpora os elementos genéticos de pelo menos um transgene e transfere estes elementos genéticos para o genoma de uma planta. O(s) transgene(s) é(são) tipicamente construído(s) em um vetor de plasmídio de DNA e é(são) normalmente flanqueado(s) por uma região de DNA de limite à direita (RB) e uma região de DNA de limite à esquerda (LB) de plasmídio Ti de *Agrobacterium*. Durante o processo de transformação mediada por *Agrobacterium*, o plasmídio de DNA é cortado por

30

uma endonuclease, VirD2, nas regiões de limite à direita e à esquerda. Uma única fita de DNA de entre os cortes, chamada a fita T, é transferida da célula de *Agrobacterium* para a célula de planta. A sequência que corresponde à região de T-DNA é inserida no genoma da planta.

5 A integração do T-DNA no genoma da planta geralmente começa na RB e continua no final do T-DNA, na LB. Entretanto, as endonucleases algumas vezes não cortam igualmente em ambos os limites. Quando isto acontece, o T-DNA que é inserido no genoma da planta freqüentemente contém algum ou todo o DNA do vetor de plasmídeo. Este fenômeno é referido
10 como "leitura completa do limite". Normalmente é preferido que somente o(s) transgene(s) localizado(s) entre as regiões de limite à direita e à esquerda (o T-DNA) seja(m) transferido(s) para o genoma da planta sem qualquer do DNA do vetor de plasmídeo adjacente (a cadeia principal do vetor). O DNA da cadeia principal do vetor contém diversos elementos de manutenção do
15 plasmídeo, incluindo, por exemplo, a origem de replicação, os genes marcadores selecionáveis bacterianos, e outros fragmentos de DNA que não são requeridos para expressar a(s) característica(s) desejada(s) em produtos comerciais de cultivo.

São dirigidos recursos consideráveis no exame do genoma de
20 plantas transgênicas de cultivo quanto à presença do DNA da cadeia principal do vetor. Métodos tais como a reação em cadeia por polimerase (PCR) e a análise por Southern blot são mais freqüentemente empregados para identificar o DNA da cadeia principal do vetor estranho. Estes métodos são consumidores de tempo e caros para o trabalho de exame em grande escala. As
25 plantas transgênicas que são verificadas conter o DNA da cadeia principal do vetor não são geralmente preferidas para a comercialização. Ademais, as plantas transgênicas que contêm mais do que dois transgenes são normalmente de pouco valor para o desenvolvimento comercial. São gastos esforços substanciais regenerando plantas a partir de cultura de células de plan-
30 tas que não têm nenhum potencial comercial.

Assim, seria de grande benefício se pudessem ser desenvolvidos métodos e composições que reduzissem muito a ocorrência de DNA da

cadeia principal do vetor no genoma de plantas transgênicas e/ou aumentassem a frequência das ocorrências de transformação com poucas cópias. Menos plantas transgênicas teriam de ser produzidas se um maior número estivesse livre do DNA da cadeia principal do vetor e mais plantas teriam uma ou duas cópias dos transgenes, aumento bastante a eficiência da produção de plantas transgênicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da invenção, proporcionam-se constructos e métodos para aperfeiçoar a qualidade das ocorrências na transformação de células de plantas mediadas de modo bacteriano, tal como a transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*. A invenção é vantajosa em proporcionar uma frequência reduzida de ocorrências de transformação de DNA da cadeia principal do vetor, isto é, a região que não é de T-DNA, e de aumentar a frequência das ocorrências de transformação de T-DNA com uma ou duas cópias do T-DNA.

A invenção também proporciona constructos de DNA para transformar as plantas, compreendendo: i) pelo menos uma região de limite de T-DNA; ii) pelo menos um transgene heterólogo adjacente à região de limite; iii) uma região de codificação para um marcador selecionável bacteriano; e iv) pelo menos um segmento de DNA, compreendendo um elemento cis e/ou trans de uma origem de replicação para manter um baixo número de cópias do constructo de DNA em uma bactéria de transformação de células de plantas.

Em certas modalidades da invenção, os elementos da origem de replicação para manter um baixo número de cópias de um constructo de DNA em uma célula bacteriana de transformação de células de plantas (competente para a transformação de células de plantas) compreendem um ou mais de *repA* (por exemplo, SEQ ID NO:32 ou SEQ ID NO:38); *repB* (por exemplo, SEQ ID NO:33 ou SEQ ID NO:39); *repC* (por exemplo, SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:40); *igs1* (por exemplo, SEQ ID NO:35 ou SEQ ID NO:41); *igs2* (por exemplo, SEQ ID NO:36 ou SEQ ID NO:42). Um constructo pode também opcionalmente incluir uma sequência palindrômica, por e-

xemplo, a sequência palindrômica de 16 bp de SEQ ID NO:37. Estes elementos podem ser arranjados em *cis* ou em *trans* em relação um ao outro.

Em algumas modalidades, a uma região de limite de T-DNA é definida como uma região de limite à direita (RB) ou uma região de limite à esquerda (LB). Além disso, em certas modalidades, as sequências de RB e/ou LB compreendem a SEQ ID NO:43 ou a SEQ ID NO:44. Nas modalidades particulares, um transgene heterólogo, quando expresso em uma célula de planta transformada, proporciona um fenótipo agrônômico para a célula ou a planta transformada derivada da célula. Nas modalidades adicionais, uma região de codificação para um marcador selecionável bacteriano é um gene de resistência a antibióticos selecionado a partir de gene de resistência à canamicina, gene de resistência à gentamicina, gene de resistência ao cloranfenicol, gene de resistência à espectinomicina, gene de resistência à estreptomicina, gene de resistência à tetraciclina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à blasticidina, gene de resistência à higromicina, gene de resistência à puromicina, ou gene de resistência à Zeocina.

Em algumas modalidades, uma origem de replicação compreende uma sequência de *repABC* selecionada a partir de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, ou 4. Em uma modalidade, o pelo menos um segmento de DNA compreende os genes de replicação *repA*, *repB*, e *repC*. Em algumas modalidades, o pelo menos um segmento de DNA compreende a sequência intergênica 1 (*igs1*) e a sequência intergênica 2 (*igs2*). Em algumas modalidades, o pelo menos um segmento de DNA compreende uma sequência palindrômica de 16 pares de bases. Em outras modalidades, o segmento de DNA compreende todas as sequências de *repABC* necessárias para manter um baixo número de cópias (1-3 cópias por célula) em *Agrobacterium* ou outras bactérias competentes para transformar células de plantas. Os constructos que contêm *repABC* e os métodos ou o seu uso são descritos em mais detalhe abaixo.

Os constructos de DNA da presente invenção podem ser transferidas para qualquer célula, por exemplo, tal como uma bactéria competente para a transformação de células de plantas. Tais bactérias são conhecidas na técnica e podem, por exemplo, pertencer às seguintes espécies: A-

grobacterium spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp. *Ochrobactrum* spp. e *Bradyrhizobium* spp. De preferência, tais bactérias podem pertencer à *Agrobacterium* spp. Os constructos de DNA da presente invenção podem adicionalmente compreender uma ou mais origens de replicação para manter as cópias do constructo na *E. coli*. Em algumas modalidades, a origem de replicação para manter as cópias do constructo na *E. coli* é derivada de pelo menos um de pBR322 e pUC.

A presente invenção também se refere a uma bactéria de transformação de células de plantas compreendendo o constructo de DNA da presente invenção, e que pode ser usada para transformar uma célula de planta. Em algumas modalidades, as bactérias de transformação de plantas são selecionadas a partir de *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp. *Ochrobactrum* spp. ou *Bradyrhizobium* spp.

A presente invenção também se refere a um método para transformar uma célula de planta compreendendo: contatar pelo menos uma primeira célula de planta com uma bactéria de transformação de célula de planta da presente invenção; e selecionar pelo menos uma célula de planta transformada com pelo menos um transgene heterólogo. Em algumas modalidades, a célula de planta é uma célula de planta de soja, canola, milho, ou algodão. Em uma modalidade, um método da invenção adicionalmente compreende regenerar uma planta a partir da célula de planta.

A presente invenção também se refere a um método de produzir alimento, ração ou um produto industrial, compreendendo: obter a planta da presente invenção ou uma parte dela; e preparar o alimento, a ração ou o produto industrial a partir da planta ou parte dela.

A invenção também inclui os métodos de transformar geneticamente as plantas com os constructos de DNA da presente invenção e reduzir a frequência de plantas transformadas com uma região do vetor que não é de T-DNA. Em algumas modalidades, a frequência de plantas transformadas com uma região que não seja de T-DNA pode ser definida como menos do que, ou igual a, cerca de 20%. Em algumas modalidades, a frequência é

menor do que, ou igual a, cerca de 15%, em algumas modalidades menor do que cerca de 10%, e em algumas modalidades menor do que, ou igual a, cerca de 8% ou 5%. Em algumas modalidades dos métodos da invenção, a frequência de ocorrências de transformação com uma ou duas cópias de T-DNA é maior do que, ou igual a, cerca de 70% ou 75%. Em algumas modalidades, esta frequência pode ser elevada para maior do que, ou igual a, cerca de 80% ou 85%, e em algumas modalidades, para maior do que cerca de 90% ou 95%.

Além de um *oriRi* de tamanho natural, a presente invenção inclui vetores de transformação de plantas contendo mutantes e variantes de *oriRi* que conservam uma função substancialmente similar à sequência de tamanho natural, quando usados na presente invenção. Por exemplo, os requerentes identificaram a sequência truncada descrita em SEQ ID NO: 3, que é adequada para uso na presente invenção. Alguém versado na técnica pode prontamente fazer alterações, remoções, substituições adicionais, etc. na sequência de *oriRi* e examinar quanto à atividade funcional usando os métodos da presente invenção. Assim, a presente invenção inclui tais variantes e mutantes.

As características e as vantagens adicionais da invenção serão apresentadas, em parte, na descrição que se segue e, em parte, serão óbvias a partir da descrição, ou podem ser aprendidas por prática da invenção. As características e as vantagens da invenção serão compreendidas e atingidas por meio dos elementos e das combinações particularmente mostrados nas reivindicações em anexo.

É para ser entendido que tanto a descrição geral precedente quanto a descrição detalhada a seguir são ilustrativas e explicativas somente e não são restritivas da invenção, conforme reivindicada.

Os desenhos que acompanham, os quais são incorporados no, e constituem uma parte deste, relatório descritivo, ilustram as diferentes modalidades da invenção e, juntamente com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

A não ser que de outro modo definidos, todos os termos técnicos

e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendidos por alguém versado na técnica à qual pertence esta invenção. A terminologia usada na descrição da invenção neste documento é para descrever modalidades particulares somente e não é pretendida ser limitativa da invenção. Conforme usadas na descrição da invenção e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" são pretendidas incluir as formas plurais também, a não ser que o contexto claramente indique de outro modo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

10 A figura 1 mostra um mapa de plasmídio de pMON83856, o vetor de base com um fragmento de *oriRi* de 5,6 kb usado para o constructo de pMON83882 para a transformação da soja e pMON97352 para a transformação do milho.

15 A figura 2 mostra um mapa de plasmídio de pMON83882, o vetor de teste com um fragmento de *oriRi* de 5,6 kb e o gene marcador selecionável de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (*CP4-EPSPS*) e o gene *uidA* (*gus*) de interesse, como um exemplo, para a transformação da soja.

20 A figura 3 mostra um mapa de plasmídio de pMON83934, um vetor de base com um fragmento de *oriRi* de 4,2 kb usado para o constructo de pMON83937.

A figura 4 mostra um mapa de plasmídio de pMON83937, um vetor de teste com um fragmento de *oriRi* de 4,2 kb e o gene marcador selecionável CP4 e o GOI (*gus*), como um exemplo, para a transformação da soja.

25 A figura 5 mostra um mapa de plasmídio de pMON97352, um vetor de teste com um fragmento de *oriRi* de 5,6 kb e o gene marcador selecionável CP4 e o GOI (*gus*), como um exemplo, para a transformação do milho.

30 A figura 6 mostra um mapa de plasmídio de pMON92726, o qual foi usado como um controle para a transformação do milho. Ele contém a mesma estrutura de gene que o pMON97352, exceto pela origem de replicação. Ele contém *oriV* em vez de *oriRi*.

A figura 7 mostra um mapa de plasmídio de pMON87488, um vetor de transformação de 2 T-DNA, o qual foi usado como um controle para a transformação da soja. Ele contém *oriV* em vez de *oriRi*.

5 A figura 8 mostra um mapa de plasmídio de pMON96001, um vetor de teste de transformação de 2 T-DNA com um fragmento de *oriRi* de 4,3 kb e o gene marcador selecionável CP4 e o GOI (*gus*), como um exemplo, para a transformação da soja.

10 A figura 9 mostra um mapa de plasmídio de pMON96010, um vetor de teste de transformação de 2 T-DNA com um fragmento de *oriRi* de 5,6 kb e o gene marcador selecionável CP4 e o GOI (*gus*), como um exemplo, para a transformação da soja.

A figura 10 mostra o efeito do tipo de origem de replicação sobre a frequência de transformação no milho. As barras de erros representam o intervalo de segurança de 95%; * indica uma diferença significativa entre *oriRi* (pMON97352) e *oriV* (pMON92726).

A figura 11 mostra o efeito do tipo de origem de replicação sobre a transferência da seqüência da cadeia principal na transformação do milho. As barras de erros representam o intervalo de segurança de 95%; * indica uma diferença significativa entre *oriRi* (pMON97352) e *oriV* (pMON92726). *oriRi/oriV*, RB, e LB indicam o tipo de sonda da cadeia principal usada.

A figura 12 mostra o efeito do tipo de origem de replicação sobre a qualidade do transgene na transformação do milho. As barras de erros representam o intervalo de segurança de 95%. 0, 1, 2, 3+ indicam o número de cópias.

25 A figura 13 mostra um mapa de plasmídio de pMON96951 contendo a origem de replicação de *repABC* a partir do plasmídio p42b de *Rhizobium etli* CFN42 e o gene marcador selecionável de EPSPS CP4 para soja.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

30 A invenção agora será descrita por referência a modalidades mais detalhadas, com referência ocasional aos desenhos que acompanham. Esta invenção pode ser concretizada, entretanto, em diferentes formas e não

deve ser interpretada como limitada às modalidades apresentadas neste documento. De preferência, estas modalidades são ilustrativas e proporcionadas de modo que esta descrição será eficiente e completa, e transmitirá inteiramente o escopo da invenção para aqueles versados na técnica.

5 A presente invenção refere-se, em parte, à descoberta que a origem de replicação *repABC*, tal como aquela de pRi de *Agrobacterium rhizogenes* ("*oriRi*" ou "*oriPRI*"), que mantém 1-3 cópias em bactérias, tais como *Agrobacterium*, pode ser usada em vetores de transformação de plantas e pode conferir ocorrências de transformação altamente desejáveis. Os vetores da invenção podem, por exemplo, reduzir significativamente a frequência de ocorrências de transformação que transferem a região que não é de T-DNA, isto é, o DNA da cadeia principal do vetor, e podem, por exemplo, aumentar significativamente o número de ocorrências de transformação com uma ou duas cópias de T-DNA, isto é, o gene de interesse. A técnica anterior não
10 ensina ou sugere o uso de *oriRi* para obter estes resultados inesperados de transformação. Os vetores e os métodos da invenção aperfeiçoam as ocorrências de transformação na preparação de plantas transgênicas de cultivo.

Conforme usado neste documento, uma planta transgênica de cultivo contém uma molécula de polinucleotídeo exógeno ou um transgene heterólogo inserido no genoma de uma célula de planta de cultivo. Uma célula de planta de cultivo inclui, sem limitação, uma célula de planta, e adicionalmente compreende culturas em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido do calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, óvulos, pólen e microesporos, e sementes, e fruta. Por "exógeno" ou "heterólogo" pretende-se uma molécula de polinucleotídeo que se origina do lado de fora da célula de planta na qual é introduzida a molécula de polinucleotídeo. Uma molécula de polinucleotídeo exógeno pode ter uma sequência de nucleotídeos de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. Alguém versado na técnica entende que uma molécula de polinucleotídeo exógeno pode ser uma molécula heteróloga derivada de uma espécie diferente de qualquer outro organismo ou da espécie de planta do que a planta na qual é introduzida a molécula de polinucleotídeos, ou pode ser uma molécula de poli-
20
25
30

nucleotídeo derivada da mesma espécie de planta que a planta na qual ela é introduzida.

O polinucleotídeo exógeno (transgene heterólogo), quando expresso em uma célula de planta transformada, proporciona uma característica agrônômica para a célula ou para uma planta transformada derivada da célula. Estes genes de interesse (GOI) proporcionam características agrônômicas benéficas para as plantas de cultura, por exemplo, incluindo, porém na limitadas aos elementos genéticos compreendendo resistência a herbicidas (Patente U.S. Nº 5.633.435; Patente U.S. Nº 5.463.175), rendimento aumentado (Patente U.S. Nº 5.716.837), controle de inseto (Patente U.S. Nº 6.063.597; Patente U.S. Nº 6.063.756; Patente U.S. Nº 6.093.695; Patente U.S. Nº 5.942.664; Patente U.S. Nº 6.110.464), resistência a doenças fúngicas (Patente U.S. Nº 5.516.671; Patente U.S. Nº 5.773.696; Patente U.S. Nº 6.121.436; e Patente U.S. Nº 6.316.407; e Patente U.S. Nº 6.506.962), resistência a vírus (Patente U.S. Nº 5.304.730 e Patente U.S. Nº 6.013.864), resistência a nematóides (Patente U.S. Nº 6.228.992), resistência a doenças bacterianas (Patente U.S. Nº 5.516.671), produção de amido (Patente U.S. Nº 5.750.876 e Patente U.S. Nº 6.476.295), produção de óleos modificados (Patente U.S. Nº 6.444.876), alta produção de óleos (Patente U.S. Nº 5.608.149 e Patente U.S. Nº 6.476.295), teor modificado de ácidos graxos (Patente U.S. Nº 6.537.750), alta produção de proteínas (Patente U.S. Nº 6.380.466), amadurecimento das frutas (Patente U.S. Nº 5.512.466), nutrição aumentada de animais e seres humanos (Patente U.S. Nº 5.985.605 e Patente U.S. Nº 6.171.640), biopolímeros (Patente U.S. Nº 5.958.745 e Pub de Patente U.S. 2003/0028917), resistência à tensão ambiental (Patente U.S. Nº 6.072.103), peptídeos farmacêuticos (Patente U.S. Nº 6.080.560), características aperfeiçoadas de processamento (Patente U.S. Nº 6.476.295), digestibilidade melhorada (Patente U.S. Nº 6.531.648), baixo teor de rafinose (Patente U.S. Nº 6.166.292), produção industrial de enzimas (Patente U.S. Nº 5.543.576), aroma aperfeiçoado (Patente U.S. Nº 6.011.199), fixação de nitrogênio (Patente U.S. Nº 5.229.114), produção de sementes híbridas (Patente U.S. Nº 5.689.041), e produção de biocombustível (Patente U.S. Nº

5.998.700), os elementos genéticos e os transgenes descritos nas patentes listadas acima são incorporados neste documento por referência.

A presente invenção proporciona constructos de DNA recombinante de plantas para produzir plantas transgênicas de cultivo. Os métodos que são bastante conhecidos para aqueles versados na técnica podem ser usados para preparar o constructo de DNA recombinante de planta de cultivo da presente invenção. Estes métodos incluem as técnicas de DNA recombinante *in vitro*, as técnicas sintéticas, e a recombinação genética *in vivo*. Tais técnicas são descritas em Sambrook e outros, (1989). As moléculas de polinucleotídeos exógenos criadas pelos métodos podem ser transferidas para uma célula de planta de cultivo por uma bactéria de transformação de planta, tal como *Agrobacterium*, ou por outros métodos conhecidos para aqueles versados na técnica de transformação de plantas. A transferência de gene para as plantas foi mostrada usando diversas espécies de bactérias, conforme descrito em Broothaerts e outros (2005) e no pedido provisório US 60800872, neste documento incorporado por referência. Os constructos de DNA recombinante da presente invenção podem ser transferidas para uma célula de planta de cultivo por transformação usando *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, ou qualquer outra bactéria capaz de transformar uma célula de planta.

A invenção inclui os vetores de transformação de plantas para uso na transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*. Os vetores da presente invenção são geralmente plasmídios, porém a origem de replicação *oriRi* pode ser substituída por outras origens de replicação da família *repABC* para manter o número de cópias muito baixo (1-3 cópias por célula) no *Agrobacterium*. Também, os vetores sem uma origem de replicação para a manutenção em *Agrobacterium* são capazes de manter eles próprios no *Agrobacterium* com seqüências no T-DNA que podem ser integradas no plasmídio Ti em *A. tumefaciens*, plasmídio Ri em *A. rhizogenes* ou no cromossomo de *Agrobacterium* através de recombinação homóloga. Isto resulta no mesmo efeito de uma redução na inserção da seqüência que não é de T-DNA e um aumento nas ocorrências de transformação com baixo número de

cópias, visto que o cromossomo, o plasmídio Ti ou Ri está presente em uma única cópia. Quando as espécies *Rhizobia* ou que não sejam de *Agrobacterium* forem usadas para a transformação de plantas, o GOI contendo o T-DNA pode ser integrado no cromossomo ou nos plasmídios de *repABC* nas bactérias hospedeiras, o que pode produzir o mesmo efeito que o *Agrobacterium* faz.

Um vetor da presente invenção pode compreender pelo menos uma de região de limite à direita ou de limite à esquerda do plasmídio Ti de *Agrobacterium*. Os vetores podem compreender pelo menos um par de limites. Os vetores podem incluir quatro pares de limites, porém o vetor frequentemente compreende um ou dois pares.

Os vetores da presente invenção podem adicionalmente compreender uma região de codificação para um marcador selecionável para a manutenção em hospedeiros bacterianos. As regiões de codificação para os marcadores selecionáveis incluem Spec/Strp que codifica para a Tn7 aminoglicosídeo adeniltransferase (*aadA*) conferindo resistência à espectinomicina ou à estreptomicina, ou um gene marcador selecionável para gentamicina (Gm, Gent). Os outros genes de resistência incluem os genes de resistência à carbenecilina, ampicilina, e canamicina. Outros são conhecidos e podem ser prontamente usados na presente invenção por aqueles versados na técnica.

Os vetores da presente invenção podem também compreender uma região de codificação para um gene marcador selecionável de planta, o qual está tipicamente localizado no T-DNA, para selecionar as células de plantas transformadas com o reagente correspondente. O marcador selecionável de planta pode proporcionar resistência a um composto de seleção positivo, por exemplo, resistência a antibióticos (por exemplo, canamicina, G418, bleomicina, higromicina, etc.), ou resistência a herbicidas (por exemplo, incluindo, porém não limitados ao: glifosato, Dicamba, glufosinato, sulfoniluréia, imidazolinonas, bromoxinil, dalapon, cicloexanodiona, inibidores da protoporfirinogênio oxidase, e herbicidas de isoxaflutol). As moléculas de polinucleotídeos que codificam proteínas envolvidas na tolerância aos herbi-

cidas são conhecidas na técnica, e incluem, porém não estão limitadas a uma molécula de polinucleotídeo codificando a) tolerância a um glifosato incluem as 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintases (EPSPS; Patente U.S. 5.627.061, Patente U.S. 5.633.435, Patente U.S. 6.040.497, Patente U.S. 5.094.945, WO04074443, e WO04009761), a glifosato oxidorreductase (GOX; Patente U.S. 5.463.175), a glifosato descarboxilase (WO05003362 e Pedido de Patente U.S. 20040177399), e a glifosato-N-acetil transferase (GAT; publicação de Patente U.S. 20030083480) conferindo tolerância ao glifosato; b) a dicamba monooxygenase (DMO, codificada por *ddmC*) conferindo tolerância aos herbicidas similares à auxina, tais como dicamba (Pedidos de Patentes U.S. 20030115626, 20030135879; Herman e outros, 2005); c) a fosfinotricina acetiltransferase (*bar*) conferindo tolerância à fosfinotricina ou ao glufosinato (U.S. 5.646.024, U.S. 5.561.236, EP 275.957; U.S. 5.276.268; U.S. 5.637.489; U.S. 5.273.894); d) a ácido 2,2-dicloropropiônico desalogenase conferindo tolerância ao ácido 2,2-dicloropropiônico (Dalapon) (WO9927116); e) a acetidroxíácido sintase ou a acetolactato sintase conferindo tolerância aos inibidores da acetolactato sintase, tais como sulfoniluréia, imidazolinona, triazolopirimidina, pirimidiloxibenzoatos e ftalida (U.S. 6.225.105; U.S. 5.767.366. U.S. 4.761.373; U.S. 5.633.437; U.S. 6.613.963; U.S. 5.013.659; U.S. 5.141.870; U.S. 5.378.824; U.S. 5.605.011); f) a haloarilnitrilase (*Bxn*) para conferir tolerância ao bromoxinil (WO8704181A1; U.S. 4.810.648; WO8900193A); g) a acetil-coenzima A carboxilase modificada para conferir tolerância à cicloexanodiona (setoxidim) e ao ariloxifenoxipropionato (haloxifop) (U.S. 6.414.222); h) a diidropteroato sintase (*sulI*) para conferir tolerância aos herbicidas de sulfonamida (U.S. 5.597.717; U.S. 5.633.444; U.S. 5.719.046); i) o polipeptídeo do fotossistema II de 32 kD (*psbA*) para conferir tolerância aos herbicidas de triazina (Hirschberg e outros, 1983); j) a antranilato sintase para conferir tolerância ao 5-metiltryptofano (U.S. 4.581.847); k) o ácido dihidrodipicolínico sintase (*dapA*) para conferir tolerância à aminoetil cisteína (WO8911789); l) a fitoeno dessaturase (*crtI*) para conferir tolerância aos herbicidas de piridazinona, tais como o norflurazon (JP06343473); m) a hidróxi-fenil piruvato dioxigenase para conferir

tolerância aos herbicidas de ciclopropilisoxazol, tais como o isoxaflutol (WO 9638567; U.S. 6.268.549); n) a protoporfirinogênio oxidase I modificada (pro-tox) para conferir tolerância aos inibidores de protoporfirinogênio oxidase (U.S. 5.939.602); e o) a ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1) para conferir

5 tolerância a um herbicida contendo uma porção de ariloxialcanoato (WO05107437). Os exemplos de tais herbicidas incluem as fenóxi auxinas (tais como 2,4-D e diclorprop), a piridilóxi auxinas (tais como o fluoroxipir e o triclopir), os inibidores da ariloxifenoxipropionatos (AOPP) acetil- coenzima A carboxilase (ACCase) (tais como haloxyfop, quizalofop, e diclofop), e os ini-

10 bidores da fenoxiacetato protoporfirinogênio oxidase IX substituídos em 5 (tais como o pyraflufen e o flumiclorac).

Além de um marcador selecionável de planta, em algumas modalidades pode ser desejável usar um gene relator. Em algumas situações, um gene relator pode ser usado com ou sem um marcador selecionável. Os

15 genes relatores são genes que não estão tipicamente presentes no organismo ou tecido receptor e tipicamente codificam as proteínas, resultando em alguma alteração fenotípica ou propriedade enzimática. Os exemplos de tais genes são proporcionados em Wising e outros (1988), que é incorporado neste documento por referência. Os genes relatores preferidos incluem a

20 beta-glicuronidase (GUS) do locus uidA de *E. coli*, o gene de cloranfenicol acetil transferase de Tn9 de *E. coli*, a proteína fluorescente verde da medusa bioluminescente *Aequorea victoria*, e os genes de luciferase do vaga-lume *Photinus pyralis*. Um ensaio para detectar a expressão do gene relator pode então ser efetuado, em um tempo adequado após o dito gene ter sido intro-

25 duzido nas células receptoras. Tal ensaio preferido envolve o uso do gene codificando a beta-glicuronidase (GUS) do locus uidA de *E. coli*, conforme descrito por Jefferson e outros (1987), para identificar as células transformadas, referido neste documento como GUS.

Em algumas modalidades, os vetores da presente invenção

30 compreendem uma origem de replicação para a manutenção em *E. coli*. Estas origens de replicação podem ser derivadas, por exemplo, de pBR322 ou de pUC. Um exemplo de tal origem de replicação é Co/E1. Os vetores da

presente invenção podem incluir qualquer origem de replicação que mantenha pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100 ou mais cópias de plasmídios em *E. coli*. Em algumas modalidades, a *ori* mantém um maior número de cópias em *E. coli* (por exemplo, mais do que 5, 10, 15, 20, 25, ou 30, e em algumas modalidades adicionais, mais do que 10, 15, 20, 25 ou 30). Tais vetores com alto número de cópias tornam mais fácil amplificar a quantidade de DNA disponível para a transformação. Assim, em algumas modalidades, a presente invenção inclui um vetor contendo uma *ori* que proporciona altos números de cópias em células de *E. coli*, e uma segunda *ori*, tal como uma *ori* pertencendo à família de *repABC*, por exemplo, *oriRi*, que mantém o número de cópias extremamente baixo, por exemplo, 1-3, em *Agrobacterium*.

Os vetores da presente invenção também compreendem pelo menos um segmento de DNA, compreendendo elementos *cis* e/ou *trans*, o qual é necessário e suficiente para a manutenção do plasmídio com baixas cópias (1-3 cópias) em uma bactéria transformadora de plantas, tal como *Agrobacterium*. O pelo menos um segmento de DNA preferivelmente compreende uma origem de replicação da família de *repABC*. Ademais, o pelo menos um segmento de DNA pode incluir uma origem de replicação de plasmídio Ri de *Agrobacterium rhizogenes* (*oriRi*) e/ou origem de *repABC* de plasmídio p42b de *Rhizobium etli*. Ainda adicionalmente, a família de *repABC* preferivelmente compreende os genes de replicação *repA*, *repB*, e *repC*. O pelo menos um segmento também pode compreender as seqüências da região intergênica, *igs1* e *igs2*. Ainda adicionalmente, o pelo menos um segmento de DNA pode incluir um palíndromo de 16 bp após *repC*.

Conforme usado aqui, a "origem de replicação" de um plasmídio de "*repABC*", isto é, um plasmídio que utiliza tais seqüências para a replicação e a divisão em uma célula, pode ser definida como compreendendo *repA* (por exemplo, SEQ ID NO:32 de pRi de *A. rhizogenes*; SEQ ID NO:38 de p42b de *R. etli*), *repB* (por exemplo, SEQ ID NO: SEQ ID NO:33 de *A. rhizogenes*; SEQ ID NO:39 de p42b de *R. etli*), *repC* (por exemplo, SEQ ID NO: SEQ ID NO:34 de *A. rhizogenes*; SEQ ID NO:40 de p42b de *R. etli*), *igs1*

(por exemplo, SEQ ID NO:35 de *A. rhizogenes*; SEQ ID NO:41 de p42b de *R. etli*), igs2 (por exemplo, SEQ ID NO:36 de *A. rhizogenes*; SEQ ID NO:42 de p42b de *R. etli*), e pode opcionalmente compreender uma sequência palindrômica (por exemplo, SEQ ID NO:37). Em outras modalidades, a origem de replicação pode compreender aquelas sequências requeridas para manter o número de cópias baixo (por exemplo, de 1 a cerca de 3 cópias) dentro de uma célula bacteriana transformadora de células de plantas. Os exemplos de tais origens de replicação de *repABC* são encontrados em SEQ ID NOs:1-4, na *oriRi* do plasmídio Ri de *A. rhizogenes*, e no plasmídio p42b de *R. etli*, entre outros.

Em uma modalidade, o pelo menos um segmento é como identificado em SEQ ID NO:1. Em outras modalidades, o pelo menos um segmento consiste essencialmente na seguinte sequência: *oriRi* de 5618 bp de bases de pMON83882 (633-6250), identificada como SEQ ID NO:2. Em uma outra modalidade, o pelo menos um segmento compreende e/ou consiste essencialmente na sequência identificada em SEQ ID NO:3. Em mais uma outra modalidade, o pelo menos um segmento pode ser *repABC* de p42b a partir de *R. etli*, como identificado em SEQ ID NO:4.

Estão incluídas na definição de qualquer da sequência de ácidos nucleicos ou polipeptídeos definida neste documento as sequências que exibem um grau especificado de identidade com tais sequências. Por exemplo, deve ser observado que, embora sejam descritas neste documento sequências de ácidos nucleicos específicas, podem ser feitas modificações nas sequências descritas, sem sair do escopo da invenção. Em particular, as sequências de ácidos nucleicos que são substancialmente idênticas àquelas apresentadas neste documento podem ser usadas com a presente invenção. Uma primeira sequência de ácidos nucleicos mostra "identidade substancial" com uma sequência de ácidos nucleicos de referência se, quando alinhada otimamente (com as inserções ou as remoções de nucleotídeos apropriadas totalizando menos do que 20 por cento da sequência de referência sobre a janela de comparação) com o outro ácido nucleico (ou sua fita complementar), houver pelo menos cerca de 75% de identidade de sequência de nucle-

- otídeos, preferivelmente pelo menos cerca de 80% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, ou 89% de identidade, e mais preferivelmente ainda pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade sobre uma janela
- 5 de comparação de pelo menos 200 posições de nucleotídeos, preferivelmente pelo menos 300 posições de nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 400 posições de nucleotídeos, e mais preferivelmente ainda sobre o comprimento inteiro do primeiro ácido nucléico. O alinhamento de seqüências ótimo para alinhar uma janela de comparação pode ser conduzido pelo
- 10 método de similaridade de Pearson e Lipman (1988); preferivelmente por implementações computadorizadas destes algoritmos no Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI. O ácido nucléico de referência pode ser uma molécula de tamanho natural ou uma porção de uma molécula mais longa.
- 15 Alternativamente, dois ácidos nucléicos têm identidade substancial se um hibridiza com o outro sob condições severas de hibridização. O termo "condições severas de hibridização" é definido como as condições sob as quais uma seqüência de teste hibridiza especificamente com (uma) seqüência(s)-alvo, porém não com as seqüências que não são alvo, conforme
- 20 pode ser determinado empiricamente. O termo "condições severas" é funcionalmente definido em relação à hibridização de uma sonda de ácido nucléico com um ácido nucléico-alvo (isto é, com uma seqüência de ácidos nucléicos particular de interesse) pelo procedimento de hibridização específica (vide, por exemplo, Sambrook e outros, 1989, em 9.52-9.55, Sambrook e
- 25 outros, 1989 em 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa, 1984; e Wetmur e Davidson, 1968). As condições severas apropriadas para a hibridização de DNA são, por exemplo, 6,0x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) em torno de 45°C, seguido por uma lavagem de 0,2x SSC a 50°C. Os detalhes de tais métodos são conhecidos para aqueles versados na técnica ou podem ser encontrados
- 30 nos manuais de laboratório, incluindo, porém não limitados ao Current Protocols in Molecular Biology (1989). Em algumas modalidades, podem ser usadas condições de severidade menores alterando-se a lavagem para cer-

ca de 2,0x SSC a 50°C. Além disso, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de condições de baixa severidade na temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, para condições de maior severidade em torno de 65°C. Tanto a temperatura quanto o sal podem ser variados, ou a temperatura ou a concentração de sal pode ser mantida constante, enquanto a
5 outra variável é alterada. Por exemplo, a hibridização usando as sondas de DNA ou RNA ou os iniciadores pode ser efetuada a 65°C em 6x SSC, 0,5% de SDS, 5x Denhardt's, 100 µg/mL de DNA não-específico (por exemplo, DNA de esperma de salmão sonificado) com lavagem a 0,5x SSC, 0,5% de
10 SDS a 65°C, para a severidade alta.

Uma molécula de ácido nucléico é dita ser o "complemento" de uma outra molécula de ácido nucléico se elas exibirem complementaridade completa. Conforme usado neste documento, as moléculas são ditas exibirem "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das
15 moléculas for complementar a um nucleotídeo da outra. Duas moléculas são ditas serem "minimamente complementares" se elas puderem hibridizar uma com a outra com estabilidade suficiente para permitir que elas permaneçam aneladas uma à outra sob pelo menos as condições convencionais de "baixa severidade". Similarmente, as moléculas são ditas serem "complementares"
20 se elas puderem hibridizar uma com a outra com estabilidade suficiente para permitir que elas permaneçam aneladas uma à outra sob as condições convencionais de "alta severidade". Contempla-se que as condições de hibridização de menor severidade, tais como as temperaturas de hibridização e/ou de lavagem menores, podem ser usadas para identificar seqüências relacionadas tendo um grau menor de similaridade de seqüência se a especificidade de ligação da sonda ou do iniciador à(s) seqüência(s)-alvo for preservada. Desse modo, as seqüências de nucleotídeos da presente invenção podem ser usadas pela sua capacidade de formar seletivamente moléculas duplas com trechos complementares de fragmentos de DNA. A detecção dos segmentos de DNA via hibridização é bastante conhecida para aqueles versados na técnica, e assim, dependendo da aplicação imaginada, desejar-se-á
30 empregar condições variadas de hibridização para atingir graus variados de

seletividade da sonda em relação à sequência-alvo e o método de escolha dependerá dos resultados desejados. As condições convencionais de severidade são descritas em Sambrook, e outros (1989) e por Haymes e outros (1985).

5 O constructo de DNA da presente invenção pode ser introduzida no genoma de um hospedeiro de planta desejado por um método adequado de transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*. Os métodos para transformar plantas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* incluem: Fraley e outros, (1985), e Rogers e outros, (1987). A transformação mediada por *Agrobacterium* é atingida através do uso de uma bactéria do solo geneticamente engenheirada que pertence ao gênero *Agrobacterium*. Diversas espécies de *Agrobacterium* medeiam a transferência de um DNA específico, conhecido como "T-DNA", que podem ser geneticamente engenheiradas para carregar qualquer pedaço desejado de DNA para muitas espécies de plantas. Os eventos principais que marcam o processo da patogênese mediada por T-DNA são a indução de genes da virulência, e o processamento e a transferência da fita T. Este processo é a matéria de muitas revisões (Ream, 1989; Howard e Citovsky, 1990; Kado, 1991; Winans, 1992; Zambryski, 1992; Gelvin, 1993; Binns e Howitz, 1994; Hooykaas e Beijersbergen, 1994; Lessl e Lanka, 1994; Zupan e Zambryski, 1995). As espécies que não são *Agrobacterium*, tais como *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, podem também ser usadas para transferir os genes usando os constructos de DNA da presente invenção (Broothaerts e outros, 2005 e o pedido provisório US 60/800.872, neste documento incorporados por referência). Podem também ser usados outros métodos para introduzir o DNA nas células. Estes métodos são bastante conhecidos para aqueles versados na técnica e podem incluir os métodos químicos e os métodos físicos, tais como a microinjeção, a eletroporação, e o bombardeio de microprojéteis.

As técnicas de regeneração de células de plantas valem-se da manipulação de certos fitos-hormônios em um meio de crescimento de cultura de tecido, também tipicamente valendo-se de um marcador de biocida e/ou herbicida que tenha sido introduzido juntamente com as sequências de

nucleotídeos desejadas. A escolha da metodologia com protocolos adequados estando disponível para hospedeiros a partir de *Leguminosae* (alfafa, soja, trevo, etc.), *Umbelliferae* (cenoura, aipo, pastinaca), *Cruciferae* (repolho, rabanete, canola/colza, etc.), *Cucurbitaceae* (melões e pepino), *Gramineae* (trigo, cevada, arroz, milho, etc.), *Solanaceae* (batata, tabaco, tomate, pimentas), diversas culturas florais, tais como girassol, e árvores contendo nozes, tais como amêndoas, cajus, nozes, e noz-pecã. Vide, por exemplo, Ammirato e outros (1984); Shimamoto e outros (1989); Fromm (1990); Vasil e outros, (1990); Vasil e outros (1992); Hayashimoto (1990); e Datta e outros (1990). Tais técnicas de regeneração são descritas, em geral, em Klee e outros (1987). Os métodos e as composições para transformar plantas por introdução de um constructo de DNA transgênica em um genoma da planta na prática desta invenção podem incluir quaisquer dos métodos bem-conhecidos e demonstrados. Por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium* é ilustrada nas Pats. U.S. Nºs 5.824.877; 5.591.616; e 6.384.301, todas as quais são incorporadas neste documento por referência.

As plantas que podem ser feitas por prática da presente invenção incluem quaisquer plantas que estejam sujeitas à transformação e à regeneração e incluem, porém não estão limitadas à, Acácia, alfafa, aneto, maçã, damasco, alcachofra, rúcula, aspargo, abacate, banana, cevada, feijão, beterraba, amora-preta, uva-do-monte, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, canola, meloa, cenoura, mandioca, couve-flor, aipo, repolho chinês, cereja, coentro, cítricos, laranjas pequenas e "clementines", café, milho, algodão, pepino, pseudotsuga, berinjela, chicória, escarola, eucalipto, erva-doce, figos, árvores da floresta, abóbora, uva, toranja, melão, batata mexicana, kiwi, alface, alhos porró, limão, lima, pinheiro teca, manga, melão, cogumelo, noz, aveia, quiabo, cebola, laranja, uma planta ornamental, mamão, salsa, ervilha, pêssego, amendoim, pêra, pimenta, caqui, pinho, abacaxi, banana-da-terra, ameixa, romã, choupó, batata, abóbora, marmelo, pinho monterey, radicchio, rabanete, framboesa, arroz, centeio, sorgo, pinho do sul, soja, espinafre, abóbora, morango, beterraba sacarina, cana-de-açúcar, girassol, batata-doce, liquidâmbar, tangerina, chá, tabaco, tomate, turfa, uma

parreira, melancia, trigo, inhames, e abobrinha. Nas modalidades preferidas, a planta é uma planta de soja, milho, canola, ou algodão. Nas modalidades particulares, a planta é uma planta de milho. Nas modalidades particulares, a planta é uma planta de soja. Em outras modalidades, a planta é uma planta de algodão. E ainda em mais modalidades, a planta é uma planta de canola.

Os presentes métodos produzem eficiências aperfeiçoadas de transformação, reduzindo significativamente a frequência de plantas transformadas com o DNA da cadeia principal do vetor, ou o "não-T-DNA". Em algumas modalidades, a frequência de plantas transformadas com não-T-DNA é menor do que, ou igual a, cerca de 20%. Em algumas modalidades, a frequência de plantas transformadas com não-T-DNA é menor do que, ou igual a, cerca de 15%, ou menor do que, ou igual a, cerca de 10%, ou menor do que, ou igual a, cerca de 8% ou 5%. Adicionalmente, os métodos da invenção produzem ocorrências de transformação com uma ou duas cópias de T-DNA muito altas. Por exemplo, em algumas modalidades, a frequência de ocorrências de transformação com uma ou duas cópias de T-DNA é maior do que, ou igual a, cerca de 70% ou 75%, conforme medida usando Southern blot. Em algumas modalidades, esta frequência é maior do que, ou igual a, cerca de 80% ou 85%, e em alguns casos, 90% ou 95%, conforme medida com Southern blot.

Em algumas modalidades, a frequência de plantas transformadas com uma região do vetor que não é de T-DNA é cerca de 50%, 40%, 20%, 15%, ou 10% menor do que a frequência de T-DNA verificada na mesma variedade de planta que tenha sido transformada com um vetor de transformação de planta que não contenha o elemento repABC, tal como o elemento *oriRi* da presente invenção. Em outras modalidades, a frequência das ocorrências de transformação com uma ou duas cópias do T-DNA é cerca de 50%, 40%, 20%, 15%, ou 10% maior do que a frequência das ocorrências de transformação com uma ou duas cópias do T-DNA em relação à mesma variedade de planta transformada com o vetor de transformação de planta que não contém o elemento repABC, tal como o elemento *oriRi* da presente invenção.

Assim, certas modalidades da presente invenção proporcionam métodos que envolvem o uso do elemento repABC, tal como a *oriRi* a partir de *Agrobacterium rhizogenes* e a origem de *repABC* a partir do plasmídio p42b de *Rhizobium etli*, incluindo as seqüências apresentadas neste documento, para reduzir a freqüência de plantas transformadas com a região do vetor que não é de T-DNA. A presente invenção também está dirigida ao uso do elemento repABC, tal como a *oriRi* a partir de *Agrobacterium rhizogenes* e a origem de repABC a partir do plasmídio p42b de *Rhizobium etli*, incluindo as seqüências apresentadas aqui, para aumentar a freqüência das ocorrências de transformação com uma ou duas cópias do T-DNA. Em algumas modalidades, ambos os métodos são empregados em combinação para obter ocorrências de transformação tendo menores freqüências de incorporação da cadeia principal e maiores freqüências de ocorrências de transformação com uma ou duas cópias de T-DNA.

15 EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são proporcionados para melhor elucidar a prática da presente invenção e não devem ser interpretados de modo algum para limitar o escopo da presente invenção. Aqueles versados na técnica reconhecerão que diversas modificações, adições, substituições, truncamentos, etc., podem ser feitos nos métodos e genes descritos neste documento, ao mesmo tempo não saindo do espírito e do escopo da presente invenção.

Exemplo 1

Preparação de Vetores

25 As etapas de clonagem seguiram os protocolos padrões descritos por Sambrook e outros (1989). O fragmento de *oriRi* de 5,6 kb, excisado de pCGN1589 com a digestão por DraI, foi usado para substituir o fragmento de *oriV* de pMON67438 que foi digerido com PshAI e BstXI e embotado com a T4 DNA polimerase. Isto resultou em um vetor de base com *oriRi* pMON83856 (figura 1). O vetor de teste com *oriRi* de 5,6 kb pMON83882 (figura 2) foi feito por inserção dos fragmentos de *gus* e CP4 a partir do vetor de controle com *oriV* pMON67438, seqüencialmente digerido com Accl (em-

botado)/BamHI, em pMON83856 que tinha sido aberto com PmeI/BamHI. Para truncar o fragmento de *oriRi*, dois iniciadores, 5' CACGTGTACAAGG-TAGAATCCGCCTGAG 3' (*oriRi* 5' promotor a montante; SEQ ID NO:5) e 5' GTATACAGGCTCTCCTTCACGATCAAC 3' (*oriRi* 3' após *repC*; SEQ ID NO:6), foram sintetizados e a PCR foi efetuada com pfu polimerase de alta fidelidade e pMON83856 como um molde. O produto da PCR foi purificado e inserido em pMON83930, que foi digerido com AfeI e XhoI e embotado com T4 DNA polimerase, para substituir o fragmento de *oriV*. O vetor resultante pMON83934 (figura 3), com a *oriRi* truncada, foi então confirmado por seqüenciamento de DNA. Para preparar o vetor de teste pMON83937 (figura 4) com uma *oriRi* truncada, o pMON83934 foi aberto com KpnI, embotado com T4 DNA polimerase, e seguido por digestão com BamHI; o fragmento de *gus* e Cp4 a partir do vetor de controle com *oriV* pMON67438 foi seqüencialmente digerido com AclI, preenchido com T4 DNA polimerase, e então adicionalmente digerido com BamHI. Os dois fragmentos foram ligados com T4 DNA ligase e resultaram no pMON83937.

Para construir o vetor de transformação de milho pMON97352 (figura 5), uma seqüência ligadora contendo os sítios de SpeI e PspOMI foi sintetizada por anelamento de dois oligos 5'-AGCTTGGGCCCCTCGAGGC TAGCACTAGTG-3' (SEQ ID NO:7 e 5'-GATCCACTAGTGCTAGCCTCGA GGGGCCCA-3' (SEQ ID NO: 8), e inserida em pMON83856 com a digestão por BamHI e HindIII. O vetor com *oriRi* intermediário resultante foi aberto com SpeI e PspOMI e ligado com os cassetes de expressão de CP4 e *gus* excisados de pMON92726 (figura 6) com digestão por NotI e SpeI (vide a figura 5, pMON97352). O vetor parental com *oriV* pMON992726 foi usado como um vetor de controle para comparar com o vetor de teste com *oriRi* do milho pMON97352.

Para construir o vetor de controle com *oriV* de 2T pMON87488 (figura 7), o limite à direita de octopina foi excisado de pMON51676, embotado com T4 DNA polimerase e inserido em pMON87485, que foi aberto com SalI/SpeI, preenchido com T4 DNA polimerase e tratado com CIP. Para preparar os vetores com *oriRi* de 2T, pMON96001 (figura 8) e pMON96010 (fi-

gura 9), a *oriV* em pMON87488 foi removida com *AfeI* e *XhoI*, o vetor foi preenchido com T4 DNA polimerase e inserido com o replicon de *oriRi* de 4,2 kb a partir de pMON83934, obtido por digestão de pMON83934 com *PmlI* e *BstZ17I*, resultando em pMON96001. O replicon de *oriRi* de 5,6 kb a partir de pCGN1589, obtido por sua digestão com digestão por *DraI*, foi inserido para produzir pMON96010.

EXEMPLO 2

Transformação da Cultura de Soja

A transformação das células de soja e a regeneração das células em plantas férteis intactas por transformação mediada por *Agrobacterium* podem ser conduzidas usando diversos métodos conhecidos na técnica. Um método para a transformação da soja (por exemplo, Patentes U.S. Nºs 6.384.301 e 7.002.058) foi utilizado com um processo de organogênese.

Os constructos de DNA descritos na presente invenção (por exemplo, o plasmídeo pMON83882, substancialmente conforme mostrado na figura 2, e o plasmídeo pMON83937, substancialmente conforme mostrado na figura 4) são transformadas em uma cepa de *Agrobacterium* acalmada ABI. Os dois vetores de controle com *oriV*, pMON67438 e pMON83898 (mesmo GOI, porém em diferentes orientações), foram também transferidos para as células de *Agrobacterium*. Dois constructos de T DNA e os respectivos controles, conforme descrito acima, foram também usados para transformar a soja. O constructo de DNA foi transferido para o *Agrobacterium* por eletroporação. Colônias individuais foram recuperadas sobre o meio LB com 50 mg/l (para os vetores com *oriRi*) ou 75 mg/l de espectinomicina e 50 mg/l de canamicina e inoculadas em 20-50 ml de meio LB líquido com a mesma seleção, em um agitador com 200 rpm. O plasmídeo no *Agrobacterium* foi verificado por digestão com enzima de restrição de plasmídeo minipreparado a partir da cultura de 10 ml. O restante da cultura líquida foi misturado com glicerol até uma concentração final de 20%, dividido em alíquotas e armazenado a -80 C como culturas de sementes.

Para preparar o inóculo de *Agrobacterium* para a transformação, 0,25-1 ml de cultura de sementes congelada foi inoculado em 250 ou 500 ml

de meio LB com a mesma seleção de antibióticos, conforme acima mencionado, e desenvolvido durante a noite a 26°C-28°C, com agitação a 200 rpm, até a fase de crescimento de mid-log. A cultura foi girada e diretamente suspensa em um meio de inoculação (meio INO) na concentração de DO₆₆₀ aproximadamente 0,3, conforme medida em um espectrofotômetro.

O cultivar de soja A3525 foi usado para a transformação mediada por *Agrobacterium*, conforme descrito (por exemplo, Patente U.S. 7.002.058). As sementes de soja foram germinadas por menos do que 14 horas, na temperatura ambiente, em meio BGM, e os explantes do meristema das sementes de soja maduras foram excisados por máquina, conforme descrito no Pedido de Patente US 20050005321. Para a sonicação em batelada, aproximadamente 100 explantes na cobertura de PLANTCON foram misturados com 20 ml da suspensão de *Agrobacterium* em meio INO e sonificados no Sonicador W-113 por 20 segundos. Para a sonicação em volume, aproximadamente 1000 explantes na cobertura de plantcon foram misturados com 100 ml da suspensão de *Agrobacterium* no meio INO e sonificados por 20 segundos. Após a sonicação, os explantes foram co-cultivados no mesmo PLANTCON por 2-4 dias, a 23°C, com período de luz/escurecimento de 16/8 horas. Então, os explantes foram transferidos para a superfície do meio de seleção WPM com 75 µM de glifosato. Cada PLANTCON continha cerca de 50 explantes. Após 2 semanas, os explantes foram transferidos novamente para o meio WPM sólido com 75 µM de glifosato, com a radícula primária inserida no meio, cada PLANTCON contendo aproximadamente 25 explantes. Os brotos com três folhas inteiramente expandidas, recuperados depois de 6-10 semanas após a inoculação, foram enraizados em meio BRM com 0,1 mg/l de IAA e seleção com glifosato a 25 µM. As platinhas enraizadas foram transferidas para a estufa para a maturidade. Os diversos meios usados para a transformação da soja são detalhados abaixo, na .

TABELA 1 Componentes dos meios para a transformação da soja	
Meio BGM para a germinação das sementes de soja	
quantidade/L	Composto
0,505 g	Nitrato de potássio
0,24 g	Nitrato de amônio
0,493 g	Sulfato de magnésio
0,176 g	Cloreto de cálcio
27,2 mg	Fosfato de potássio monobásico
1,86 mg	Ácido bórico
5,07 mg	Sulfato de manganês
2,58 mg	Sulfato de zinco
0,249 mg	Iodeto de potássio
0,216 mg	Molibdato de sódio
0,00025 mg	Sulfato de cobre
0,00025 mg	Estoque de cloreto de cobalto
3,36 mg	EDTA dissódico
2,49 mg	Sulfato ferroso
1,34 mg	Tiamina HCl
0,5 mg	Ácido nicotínico
0,82 mg	Piridoxina HCl
20 g/L	Sacarose (Ultra Pura)
1,29 g	Gliconato de Cálcio (Sigma nº G4625)
60 mg	Benomil
pH	5,6
Meio INO para a co-cultura da soja	
quantidade/L	Composto
Componentes do meio 1/10 B5	
1 g	Nitrato de Potássio (KNO ₃)
30 g	Glicose
3,9 g	MES (pH 5,4)
Após esterilização em autoclave, o ácido lipóico é adicionado ao inóculo até uma concentração final de 250 µM	
Meio WPM de formação de broto de SOJA	
quantidade/L	Composto
2,41 g	Pó WPM (Phytotech Lab)
Adicionar o WPM na água, com agitação, em um agitador magnético. Após dissolução, adicionar os compostos a seguir, seqüencialmente:	
20 g	Sacarose (Ultra Pura)
1,29 g	Gliconato de Cálcio (Sigma)
60 mg	Benomil (ou nenhum fungicida)
4,0 g	Gel de Ágar (pH 5,6)

Continuação

TABELA 1 Componentes dos meios para a transformação da soja	
Meio BGM para a germinação das sementes de soja	
quantidade/L	Composto
mL/L	Ingredientes após a esterilização em autoclave
4 mL	Cefotaxima (50 mg/mL)
1 ml	Ticarcilina (100 mg/ml)
5 mL	Carbenicilina (40 mg/mL)
0,15 mL	Glifosato (Estoque 0,5 FS) (0,075 mM)
Meio BRM de formação de raiz	
quantidade/L	Composto
2,15 g	Pó MS (Gibco/Invitrogen)
0,1 g	mio – Inositol
2 mg	Glicina
0,5 mg	Ácido nicotínico
0,5 mg	Pirodoxina HCl
0,5 mg	Tiamina HCl
30 g	Sacarose (Ultra Pura)
10 ml	L-Cisteína (10 mg/ml)
8 g	Ágar Lavado
mL/L	Ingredientes após a esterilização em autoclave
5,0	IAA (0,033 mg/ml em 1 mM de KOH)
1 mL	Ticarcilina (100 mg/ml)
0,05 mL	Glifosato (Estoque 0,5 FS) (0,025 mM)
0,1 mL	IAA (1,0 mg/ml)

Outras células de plantas dicotiledôneas podem ser transformadas e regeneradas em plantas intactas por métodos conhecidos na técnica de transformação de planta e cultura de tecido. O uso de métodos mediados por *Agrobacterium* para transferir o T-DNA dos plasmídios da presente invenção é bastante conhecido na técnica. Por exemplo, algodão (Pats. U.S. N^{os} 5.004.863; 5.159.135; 5.518.908, 5.846.797, e 6.624.344, incorporadas por referência neste documento) e *Brassica* (Patente US N^o 5.750.871).

Exemplo 3Transformação de Cultura de Milho

Dois vetores, pMON97352 (*oriRi*, cópia única em *Agrobacterium*) e pMON92726 (*oriV*, múltiplas cópias em *Agrobacterium* como um controle) contendo os mesmos cassetes de gene marcador selecionável de planta CP4 e gene *gus*, ambos dirigidos por promotores de actina do arroz (figura

5), foram eletroporados na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* ABI para a transformação do milho. O *Agrobacterium* contendo o vetor em estoque de glicerol foi riscado sobre meio LB sólido suplementado com os antibióticos (tudo em ingrediente ativo) canamicina (40 mg/L), espectinomicina (31 mg/L),
5 estreptomicina (38 mg/L) e cloranfenicol (25 mg/L) e incubado a 28°C por 2 dias. Dois dias antes da inoculação em *Agrobacterium* dos embriões imaturos do milho, uma colônia ou um pequeno laço de *Agrobacterium* da placa de *Agrobacterium* foi coletado e inoculado em 25 mL de meio LB líquido suplementado com 62 mg/L de espectinomicina e 40 mg/L de canamicina, em
10 um frasco de 250 mL. O frasco foi colocado sobre um agitador a aproximadamente 150-200 rpm e 27-28°C, durante a noite. A cultura de *Agrobacterium* foi então diluída (1 para 5) no mesmo meio líquido e colocada de volta sobre o agitador. Diversas horas depois, um dia antes da inoculação, as células de *Agrobacterium* foram giradas a 3500 rpm por 15 min. O pélete de
15 células de bactéria foi ressuspensão em caldo de indução com 200 µM de acetossiringona e 50 mg/L de espectinomicina e 25 mg/L de canamicina e a densidade da célula foi ajustada para 0,2 em DO₆₆₀. A cultura de células de bactérias (50 mL em cada frasco de 250 mL) foi então colocada de volta sobre o agitador e desenvolvida durante a noite. Na manhã do dia da inoculação, as células de bactérias foram giradas e lavadas com meio líquido 1/2
20 MS VI (Tabela 2), suplementado com 200 µM de acetossiringona. Após uma centrifugação mais, o precipitado de células de bactérias é suspenso novamente em meio 1/2 MS PL (Tabela 2) com 200 µM de acetossiringona (Tabela 2) e a densidade da célula foi ajustada para 1,0 em DO₆₆₀ para a inoculação.
25

Os reagentes estão comercialmente disponíveis e podem ser adquiridos de diversos fornecedores (vide, por exemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

Tabela 2 Meios usados no Exemplo 3

Componente	½ MSVI	½ MSPL	Meio de co-cultura	MS de Indução	MSW50	MS/6BA	MSOD
Sais de MS	68,5 g/L	68,5 g/L	2,2 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L
Sacarose	20 g/L	68,6 g/L	20 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L	---
Maltose	---	---	---	---	---	---	20 g/L
Glicose	10 g/L	36 g/L	10 g/L	---	---	---	10 g/L
1-Prolina	115 mg/L	115 g/L	115 g/L	1,36 g/L	1,38 g/L	1,36 g/L	---
Ácidos Casamino	---	---	---	50 mg/L	500 mg/L	50 mg/L	---
Glicina	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	---	2 mg/L	---	---
1-Asparagina	---	---	---	---	---	---	150 mg/L
mio-Inositol	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	---	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
Ácido Nicotínico	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	1,3 mg/L	0,5 mg/L	1,3 mg/L	1,3 mg/L
Piridoxina HCl	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,25 mg/L	0,5 mg/L	0,25 mg/L	0,25 mg/L
Tiamina HCl	0,1 mg/L	0,1 mg/L	0,6 mg/L	0,25 mg/L	0,6 mg/L	0,25 mg/L	0,25 mg/L
Pantotenato de Ca	---	---	---	0,25 mg/L	---	0,25 mg/L	0,25 mg/L
2,4-D	---	---	3 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	---	---
Picloram	---	---	---	2,2 mg/L	---	---	---
Nitrato de Prata	---	---	1,7 mg/L	1,7 mg/L	---	---	---
BAP	---	---	---	---	---	3,5 mg/L	---

Os meios ½ MSVI e ½ MSPL foram usados como líquidos. O meio de co-cultura foi solidificado com 5,5 mg/L de agarose com baixo teor de EEO. Todos os outros meios foram solidificados com 3 g/L de fitigel para a seleção com glifosato.

A linhagem de milho LH244 (Patente U.S. Nº 6.252.148) foi usada neste estudo. As espigas contendo os embriões imaturos foram colhidas e mantidas refrigeradas a 4°C até o uso. Os embriões imaturos foram isolados das espigas esterilizadas na superfície e diretamente gotejados na suspensão de células de *Agrobacterium* preparada em tubo de microcentrífuga e inoculados por 5 a 20 min. Após a suspensão de células de *Agrobacterium* ser removida usando uma pipeta de transferência estéril com ponta fina, os embriões imaturos foram transferidos para o meio de co-cultura (Tabela 2). Os embriões foram cultivados em uma incubadora escura (23°C) por aproximadamente 24 h.

Após o co-cultivo, os embriões foram transferidos para um meio MS modificado (MS de Indução, Tabela 2) suplementado com 500 mg/L de carbenicilina e glifosato a 0,1 mM a 30°C, por 2 semanas, seguidas por uma semana adicional em uma sala de cultura escura, a 27-28°C. Todos os pedaços de calos foram então transferidos individualmente para o primeiro meio de regeneração, o mesmo meio mencionado acima, exceto que 2,4-D e picloram foram substituídos por 3,5 mg/L de BAP (MS/6BA, Tabela 2) e o nível de carbenicilina foi gotejado para 250 mg/L. As culturas foram movidas para uma sala de cultura com fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de escuro e 27°C. Após 5-7 dias, os pedaços de calos foram transferidos para o segundo meio de regeneração (MSOD, Tabela 2). Em outras 2 semanas, os pedaços de calos que tinham brotos regenerados foram transferidos para o mesmo meio sem hormônio em Phytatrays® para mais desenvolvimento. As plantas regeneradas (R0) com uma ou mais raízes saudáveis foram movidas para o solo em potes de turfa em uma câmara de crescimento. Em 7 a 10 dias, elas foram transplantadas para potes de 30,48 cm (12 polegadas) e movidas para uma estufa com condições para o crescimento normal da planta de milho. As plantas foram autopolinizadas ou cruzadas com plantas do tipo selvagem.

EXEMPLO 4

30 Análise Molecular para o DNA da Cadeia Principal e o Número de Cópias

A. Soja transformada com Constructos de Um T-DNA

O DNA foi extraído das amostras de tecidos coletadas das plan-

tas desenvolvidas em estufa, transformadas com os plasmídios de DNA da presente invenção. Um método à base de PCR foi usado para testar o DNA quanto à presença da seqüência de *oriRi* usando o iniciador dianteiro de *repA* 5'-ACAAGGTAGAATCCGCCTGAG-3' (Xd487b; SEQ ID NO:11) e o iniciador reverso de *repA* 5'-TTCAACTCTGGCATCTCAGAC-3' (Xd488; SEQ ID NO:12) como um indicador da cadeia principal do vetor. Este DNA está adjacente à LB e a sua presença no DNA extraído das plantas regeneradas indica que ocorreu a transferência das seqüências do vetor além da LB. O DNA pode ser isolado dos tecidos das plantas por qualquer número de métodos, por exemplo, o procedimento de CTAB (Rogers e outros, 1985) ou o Kit de Planta DNAeasy® 96 (Nº do Cat. 69181, Qiagen Inc., Valencia, Calif.) seguindo as instruções dos fabricantes. O Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) é descrito como um método de detectar e quantificar a presença de uma seqüência de DNA e é inteiramente entendido nas instruções fornecidas pelo fabricante. As moléculas de iniciadores de DNA (SEQ ID NO:11 e 12) foram usadas no método descrito para identificar o DNA de *oriRi* a partir dos extratos de plantas. As condições e o aparelho usados podem ser modificados por aqueles versados na técnica para proporcionar os mesmos resultados.

Os eixos dos meristemas da soja excisados das sementes maduras foram transformados com um plasmídio de DNA de controle (pMON67438 ou pMON83898) e um plasmídio da presente invenção (pMON83882 ou pMON83937), então regenerados nas plantas intactas. As plantas intactas foram analisadas quanto à presença do gene de interesse (CP4) e das seqüências de *oriRi* e *oriV* sem T-DNA. A Tabela 3 mostra os resultados desta análise.

Das 39 plantas testadas, somente 3 tinham seqüências da cadeia principal do vetor, uma freqüência de 7,7%. Em comparação, o plasmídio de controle (um plasmídio com *oriV*) exibiu uma freqüência da cadeia principal do vetor de 21% a 25% (dependendo de quais amostras foram consideradas). Esta diferença é bem dramática e inteiramente inesperada.

Um outro componente importante de uma planta transgênica

comercialmente viável é a ocorrência da baixa complexidade do inserto. Isto é freqüentemente referido como "baixo número de cópias". É difícil selecionar a progênie e reproduzir com êxito a característica transgênica se o número de cópias do inserto for muito alto. Idealmente, somente uma única cópia do transgene estaria presente em uma ocorrência transgênica.

O número de cópias pode ser determinado por diversos métodos conhecidos na técnica da biologia molecular. A análise por Southern blot é o método mais comumente usado. Os métodos que utilizam a tecnologia Invader® (Third Wave Inc. Madison, WI) são também usados para determinar o número de cópias dos insertos de T-DNA nas plantas transgênicas.

As células de plantas de soja foram transformadas com um plasmídio de DNA de controle (pMON67438) e um plasmídio da presente invenção (pMON83882), então regeneradas nas plantas intactas, conforme acima descrito. As plantas transgênicas resultantes foram analisadas quanto ao número de cópias usando dois métodos diferentes: 1) o método do "Invader CP4" e 2) a Southern blot. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeitos da cadeia principal do vetor de pRi ori sobre a freqüência da transformação, o número de cópias, e o inserto na transformação da soja. ^a Dados reunidos a partir de três experimentos em conjunto. ^b Número de plantas a partir da comparação em conjunto. ^c Número de plantas reunidas de plantas de pMON67438 produzidas.

pMON	TF ^a	Cadeia Principal	Invader CP4 1 Cópia	Invader CP4 1+2 Cópias	Southern Nº de Cópias de GUS
83882 (<i>oriRi</i> de 5,6 kb)	1,26%	7,7% (3/39) <i>oriRi</i>	41% (16/39)	79,5% (31/39)	56,4% (22/39) 1 Cópia 33,3% (13/39) 2 Cópias
67438 (<i>oriV</i>)	1,4%	21% (8/38) ^b 25% (56/226) ^c <i>oriV</i>	37% (14/38) 25% (57/226)	60% (23/38) 63% (142/226)	N/D N/D

Utilizando o método do "Invader CP4", o plasmídio inventivo, pMON83882, resultou em ocorrências de transformação com uma única cópia 41% do tempo, em comparação com o plasmídio de controle pMON67438, que resultou em uma ocorrência de transformação com uma única cópia somente 25% do tempo, usando as amostras reunidas de outros experimentos, ou

somente 37% do tempo, usando os experimentos em conjunto. Considerando as ocorrências de uma e de duas cópias juntas, o pMON83882 resultou nas ditas ocorrências 79,5% do tempo, em comparação com 60% a partir dos experimentos em conjunto e 63% a partir das amostras reunidas empregando o plasmídio de controle. Usando a comparação por Southern blot, o pMON83882 produziu ocorrências com uma cópia 56,4% do tempo e 33,3% do tempo ocorrências com duas cópias, para um total de quase 90% de ocorrências com uma e duas cópias combinadas. Novamente, estes resultados tanto foram dramáticos quanto inesperados.

10 **B. Análise Molecular do Número de Cópias de Transgene em Transformantes com Dois T-DNA de Soja.**

Para analisar o impacto de *oriRi* sobre a transformação com 2T-DNA, o vetor com *oriRi* de 4,2 kb de 2T pMON96001 foi comparado em conjunto com o vetor com *oriV* de 2T pMON87488 por seis vezes. O vetor com *oriRi* de 5,6 kb de 2T pMON96010 foi também incluído nos últimos dois experimentos de comparação nestes experimentos preliminares (Tabela 4, Grupo A). O DNA total foi extraído dos segmentos de sementes das sementes maduras colhidas da estufa e usado para determinar o número de cópias do transgene pela tecnologia Invader usando a sonda de CP4 e as sondas de NOS. O ensaio de detecção CP 4 Invader® usou a sequência a seguir como um sítio de alvejamento: 5' TCGCTTTCCTTGACGCGGAGTTCTTCCAGACCGTTCAT CACGG 3' (SEQ ID NO: 13) e GTAGGTGATTGGCGTTG (SEQ ID NO:14) como uma sequência de sonda. O ensaio de detecção NOS Invader® usou a seguinte sequência em 3' como um sítio de alvejamento

25 TGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTACATGTAATGCATGACT (SEQ ID NO:15 e GTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGA (SEQ ID NO:16) como sequência de sonda NOS Invader®.

Os transformantes com 1 e/ou 2 cópias foram aumentados de 35% no vetor com *oriV* de controle para acima de 40% em ambos os vetores com *oriRi*. A frequência de plantas sem marcadores nas plantas R0 (ocorrências sem marcadores/plantas R0 totais) foi aumentada de 4,76% no vetor de controle com *oriV* para 16,4% e 18,4%, respectivamente, no vetor com

30

duas *oriRi*. Globalmente, a frequência de transformação sem marcador (ocorrências sem marcadores/número inicial de explantes) mais do que duplicou nos dois vetores com *oriRi* de 2T comparados ao vetor com *oriV* de 2T.

Experimentos adicionais em paralelo com maior número inicial de explantes foram usados para comparar o vetor com *oriV* de controle de 2T com o vetor com *oriRi* de 4,2 kb de 2T (Tabela 4, Grupo B). O vetor com *oriRi* de 2T reproduziu os resultados: a frequência de ocorrências com 1+2 cópias e a frequência sem marcador (% de MF) são ambas aumentadas e a frequência de transformação sem marcador é mais do que duplicada no vetor com *oriRi*. Os resultados indicaram que os vetores com *oriRi* de 2T são significativamente mais eficientes em produzir plantas sem marcadores do que o vetor com *oriV* de 2T, por aumento das ocorrências com poucas cópias e melhora da frequência de transformação sem marcador.

Tabela 4 - Efeito do tipo de origem de replicação sobre a transformação por vetor com 2T-DNA da soja. Observação: 1) TF: frequência de transformação = plantas R0/explantes totais; 2) Co-T com 1+2 cópias: co-transformantes com 2 T-DNA com marcador de gus e CP4 com 1 e/ou 2 cópias. Somente as ocorrências com 1-2 cópias foram adicionalmente avançadas para analisar a segregação dos marcadores nas sementes; 3) ocorrências de MF: ocorrências sem marcadores, positivas para o gene gus, a partir dos co-transformantes com 1+2 cópias, analisadas por segregação das sementes; 4) % de plantas com MF: plantas sem marcadores, positivas para gus/nº de plantas R0; 5) Frequência de transformação sem marcador (TF MF) = nº de ocorrências não ligadas/ nº inicial de explantes.

Construto	Total de Explantes	nº de plantas R0	TF1 (%)	Co-T com 1+2 cópias 2	Ocorrências de MF 3 (analisadas)	% de MF 4 das plantas	TF MF 5
Grupo A							
pMON87488 (oriV)	4318	84	1,95	32,9% (25/76)	4 (25)	4,76% (4/84)	0,09%
pMON96001 (oriRi de 4,2 kb)	4757	67	1,41	42,4% (25/59)	11 (24)	16,41% (11/67)	0,23%
pMON96010 (oriRi de 5,6 kb)	1575	38	2,41	41,7% (15/36)	7 (15)	18,42% (7/38)	0,44%
Grupo B							
pMON87488 (oriV)	11024	145	1,31	35,7% (30/84)	9 (30)	6,2% (9/145)	0,08%
pMON96001 (oriRi de 4,2 kb)	8660	107	1,24	43,8% (39/89)	16 (38)	14,95% (16/107)	0,18%

C. Análise Molecular do DNA da Cadeia Principal do Vetor e do Número de Cópias do Transgene em Milho Transformado com Construtos de um T-DNA

Para investigar o efeito da origem de replicação *oriRi* sobre a transformação do milho, o vetor com *oriRi* de 5,6 kb pMON97352 contendo os genes *gus* e CP4, ambos dirigidos pelo promotor de actina do arroz, foi comparado ao vetor com *oriV* pMON92726 como a mesma estrutura de T-DNA contendo os genes *gus* e CP4. Os embriões imaturos do milho do cultivar LH244 foram inoculados com *Agrobacterium* contendo o vetor com *oriRi* ou o com *oriV* em paralelo. Cada tratamento consistia em cerca de 110 embriões. No total, 16 experimentos de comparação em conjunto foram iniciados. O vetor com *oriRi* mostrou uma frequência de transformação significativamente menor do que o vetor de controle com *oriV* (figura 10), com TF média de 9,5% e 16,3% para os vetores com *oriRi* e *oriV*, respectivamente. Entretanto, a eficiência de transformação global com os vetores com *oriRi* e *oriV* foi a mesma.

A presença da sequência da cadeia principal nas plantas de milho transgênicas foi determinada pelo ensaio Endpoint TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) para a sequência de *oriRi* ou *oriV*, as sequências de LB que estão flanqueando a 3' para a leitura completa curta próxima ao sítio de corte de LB e as sequências de RB que estão flanqueando a 5' antes do sítio de corte de RB para a leitura completa da cadeia principal intacta. Os iniciadores de *oriV* são 5' AACGCCTGATTTTACGCGAG 3' (dianteiro; SEQ ID NO: 17) e 5' CAATACCGCAGGGCACTTATC 3' (reverso; SEQ ID NO:18), com a sonda CCCACAGATGATGTGGAC (SEQ ID NO:19) rotulada com o corante fluorescente 6-FAM na extremidade de 5'. Os iniciadores de *oriRi* são 5' TGGCAAGGAATGGGTTTGAG 3' (dianteiro; SEQ ID NO:20) e 5' CTACAACTACAGGCGCTGCTTTT 3' (reverso; SEQ ID NO:21), com a sonda 6-FAM-TGGCGAAGTCTGTCC (SEQ ID NO:22) para detectar a sequência de *oriRi* 621 bp a jusante do sítio de corte de LB. Os iniciadores de flanco a 5' de RB são 5' GCCAAGGGATCTTTTGGGAAT 3' (dianteiro; SEQ ID NO:23) e 5' CCACCCAAACGTCGGAAA 3' (reverso; SEQ ID NO:24),

com a sonda 6FAM-TGCTCCGTCGTCAGG (SEQ ID NO:25) para detectar o flanco a 5' de RB 186 bp antes do sítio de corte de RB. Os iniciadores para detectar LB 35 bp a jusante do sítio de corte de LB eram 5' GCACCCGGTGGAGCTT 3' (dianteiro; SEQ ID NO:26) e 5' TCTGCCTAACC GGCTCAGT 3' (reverso; SEQ ID NO:27), com a sonda CATGTTGGTTTC TACGCAG (SEQ ID NO:28) rotulado com o corante fluorescente 6-FAM na extremidade de 5'. Aproximadamente 10 ng de DNA foram usados para a reação do Endpoint TaqMan® de acordo com a instrução do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Conforme mostrado na Figura 11, aproximadamente 95% das plantas transgênicas derivadas do vetor com *oriRi* estavam livres da cadeia principal, o que é significativamente melhor do que o vetor de controle com *oriV* mostrando aproximadamente 78% de frequência sem a cadeia principal. Visto que a cadeia principal do vetor começa em LB, após o sítio de corte, e termina antes do sítio de corte de RB, o uso de três sondas diferentes da cadeia principal (LB a jusante, *oriRi/oriV* e RB a montante) nas plantas derivadas dos vetores tanto com *oriRi* quanto com *oriV* revelou que a maior parte da cadeia principal do vetor transferida continha a sequência inteira da cadeia principal do vetor.

O número de cópias do transgene CP4 foi determinado pelo ensaio Invader® de acordo com a instrução do fabricante (Third Wave Technologies Inc. Madison, WI) usando a sequência de CP4. O número de cópias do transgene *gus* foi medido por determinação do terminador transcricional do cassete de *gus* (mostrado como Pis 4 nas figuras 5 e 6) usando a tecnologia de TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os iniciadores de *pinII* de TaqMan® eram 5' ATGAAATAAAAGGATGCACACAT 3' (dianteiro; SEQ ID NO:29) e 5' ACAACTTTGATGCCACATT 3' (reverso; SEQ ID NO:30), com a sonda TGACATGCTAATCAC- (SEQ ID NO:31) rotulada com os corantes fluorescentes 6-FAM na extremidade de 5' e MGBNFQ na extremidade de 3'.

A figura 12 mostra os resultados do ensaio do número de cópias do transgene. O vetor com *oriRi* aumentou significativamente a frequência

de plantas com cópias individuais comparado ao vetor com *oriV* de controle, enquanto que a frequência de ocorrências com 2 ou mais cópias no vetor com *oriRi* foi diminuída. Ambos os ensaios TaqMan® e Invader® com duas sondas diferentes mostraram resultados similares. Visto que as plantas sem a cadeia principal com cópias individuais são as mais valiosas tanto para a pesquisa quanto para o desenvolvimento, o vetor com *oriRi* que aumenta a frequência com cópia única e que diminui as ocorrências contendo a cadeia principal no milho representa um aperfeiçoamento significativo para a qualidade na produção de ocorrências transgênicas.

10 Exemplo 5

Constructo de vetor de transformação de planta contendo a origem de replicação de *repABC* a partir de *Rhizobium*

Para clonar a origem de replicação de *repABC* a partir da cepa de *Rhizobium etli* CFN42, a cepa da USDA foi obtida do USDA Rhizobium Collection Center. Um fragmento de *repABC* de 4,3 kb foi amplificado a partir do plasmídio de *R. etli* p42b encontrado na cepa CFN42, por PCR, com os iniciadores 5' CCACGTGAGTTACGGCTGATCGACCAGAC 3' (Xd745; SEQ ID NO:9) e 5' GCCTAGGACGTCAACTCCAACCGCACCGT 3' (Xd746; SEQ ID NO:10), e ligado ao vetor de clonagem de embotar TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), o que resultou em pMON96941 e foi confirmado por seqüenciamento. O fragmento de *repABC* foi digerido com PmlI e AvrII (mostrados pela seqüência sublinhada nos iniciadores) e ligado ao pMON96948 aberto com SmaI e AvrII. O ligado foi transferido diretamente para as células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* AB2 (uma cepa sensível à canamicina), e preparado sobre placa de LB com 50 mg/l de canamicina. As colônias resistentes à can foram inoculadas em meio LB líquido com 50 mg/l de canamicina, e um DNA de plasmídio foi preparado por miniprep. O constructo foi confirmado através de digestão por restrição. Visto que o vetor pMON96951 não contém uma origem de replicação de *E. coli*, ele não pode ser mantido na *E. coli*.

O pMON96951 (figura 13) é usado para transformar as espécies de plantas conforme descritas acima. As ocorrências transgênicas são anali-

sadas quanto à integração reduzida da cadeia principal do vetor e à alta frequência de ocorrências de transformação com poucas cópias pelos métodos descritos no Exemplo 4.

- 5 As outras modalidades da invenção serão aparentes para aqueles versados na técnica a partir de consideração do relatório descritivo e prática da invenção descrita neste documento. Pretende-se que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados como ilustrativos somente, com um escopo e um espírito verdadeiros da invenção sendo indicados pelas reivindicações que se seguem.

LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

As que seguem são incorporadas neste documento por referência:

- Patente U.S. 4.581.847; Patente U.S. 4.761.373; Patente U.S. 4.810.648;
- 5 Patente U.S. 5.004.863; Patente U.S. 5.013.659; Patente U.S. 5.034.322;
- Patente U.S. 5.094.945; Patente U.S. 5.141.870; Patente U.S. 5.159.135;
- Patente U.S. 5.229.114; Patente U.S. 5.273.894; Patente U.S. 5.276.268;
- Patente U.S. 5.304.730; Patente U.S. 5.378.824; Patente U.S. 5.463.175;
- Patente U.S. 5.463.175; Patente U.S. 5.512.466; Patente U.S. 5.516.671;
- 10 Patente U.S. 5.518.908; Patente U.S. 5.543.576; Patente U.S. 5.561.236;
- Patente U.S. 5.591.616; Patente U.S. 5.597.717; Patente U.S. 5.605.011;
- Patente U.S. 5.608.149; Patente U.S. 5.627.061; Patente U.S. 5.633.435;
- Patente U.S. 5.633.437; Patente U.S. 5.633.444; Patente U.S. 5.637.489;
- Patente U.S. 5.646.024; Patente U.S. 5.689.041; Patente U.S. 5.716.837;
- 15 Patente U.S. 5.719.046; Patente U.S. 5.750.871; Patente U.S. 5.750.876;
- Patente U.S. 5.767.366; Patente U.S. 5.773.696; Patente U.S. 5.824.877;
- Patente U.S. 5.846.797; Patente U.S. 5.939.602; Patente U.S. 5.942.664;
- Patente U.S. 5.958.745; 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. 6.040.497;
- 20 Patente U.S. 6.063.597; Patente U.S. 6.063.756; Patente U.S. 6.072.103;
- Patente U.S. 6.080.560; Patente U.S. 6.093.695; Patente U.S. 6.110.464;
- Patente U.S. 6.121.436; Patente U.S. 6.166.292; Patente U.S. 6.171.640;
- Patente U.S. 6.225.105; Patente U.S. 6.228.992; Patente U.S. 6.252.148;
- Patente U.S. 6.268.549; Patente U.S. 6.316.407; Patente U.S. 6.380.466;
- 25 Patente U.S. 6.384.301; Patente U.S. 6.414.222; Patente U.S. 6.444.876;
- Patente U.S. 6.476.295; Patente U.S. 6.506.962; Patente U.S. 6.531.648;
- Patente U.S. 6.537.750; Patente U.S. 6.613.963; Patente U.S. 6.624.344;
- Patente U.S. 7.002.058; Pub. de Patente U.S. 2003/0028917; Pub. de Patente U.S. 20040177399; Pub. de Patente U.S. 20030083480; Pub. de Patente U.S. 20030115626; Pub. de Patente U.S. 20050005321; Pub. de Patente U.S. 20030135879; Ped. Prov. U.S. 60/800.872;
- 30

- Ped. PCT WO04074443; Ped. PCT WO04009761; Ped. PCT WO9927116;
 Ped. PCT WO8704181A1; Ped. PCT WO8900193A; Ped. PCT WO8911789;
 Ped. PCT WO 9638567; Ped. PCT WO05107437; Ped. PCT WO05003362
 Ped. Europeu 275.957
- 5 Ped. Japonês 06343473
- Ammirato e outros, Em: *Handbook of Plant Cell Culture--Crop Species*, Macmillan Publ. Co., 1984.
- Ausubel e outros, Em: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 6.3.1-6.3.6, 1989.
- 10 Binns e Howitz, In: *Bacterial Pathogenesis of plants and Animals*, Dang (Ed.), Berlin: Stringer Verlag, 119-138, 1994.
- Broothaerts e outros, *Nature*, 433:629-633, 2005.
- Datta e outros, *Bio/Technology*, 8:736-740, 1990.
- Fraley e outros, *Bio/Technology*, 3:629-635, 1985.
- 15 Fromm, UCLA Symposium on Molecular Strategies for Crop Improvement, 16-22 de abril, CO, 1990.
- Gelvin, Em: *Transgenic Plants*, Kung e Wu (Eds.), Academic Press, San Diego, 49-87, 1993.
- Hayashimoto, *Plant Physiol.*, 93:857-863, 1990.
- 20 Haymes e outros, Em: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C., 1985
- Herman e outros, *J. Biol. Chem.*, 280(26):24759-24767, 2005.
- Hooykaas e Beijersbergen, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 32:157-179, 1994.
- Howard e Citovsky, *Bioassays*, 12:103-108, 1990.
- 25 Jefferson e outros, *Biochem. Soc. Trans.*, 15:7-19, 1987.
- Kado, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10:1-32, 1991.
- Kanehisa, *Nucl. Acids Res.*, 12:203-213, 1984.
- Klee e outros, *Ann. Rev. Plant Phys.*, 38:467-486, 1987.
- Lessl e Lanka, *Cell*, 77:321-324, 1994.
- 30 Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(8):2444-2448, 1988.
- Ream; *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27: 583-618, 1989.
- Rogers e outros, *Methods Enzymol.*, 153:253-277, 1987.

Rogers e outros, *Plant Mol. Biol.*, 5:69-76, 1985.

Sambrook e outros, Em: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- 5 Sambrook e outros, Em: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 9.52-9.55, 1989.

Sambrook e outros, Em: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 9.47-9.52, 9.56-9.58, 1989.

Shimamoto e outros, *Nature*, 338:274-276, 1989.

- 10 Vasil e outros, *Bio/Technology*, 10:667-674, 1992.

Vasil e outros, *Bio/Technology*, 8:429-434, 1990.

Wetmur e Davidson, *J. Mol. Biol.*, 31:349-370, 1968.

Winans, *Microbiol. Rev.*, 56:12-31, 1992.

Wising e outros *Ann. Rev. Genetics*, 22, 421, 1988.

- 15 Zambryski, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 465-490, 1992.

Zupan e Zambryski, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27:583-618, 1995.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> YE, XUDONG
 GILBERTSON, LARRY A.
 PETERSON, MICHAEL W

<120> VETORES E MÉTODOS PARA A EFICIÊNCIA APERFEIÇOADA DE TRANS-
 FORMAÇÃO DE PLANTAS

<130> MONS:124W0

<140> DESCONHECIDO
 <141> 2006-09-06

<150> 60/714,501
 <151> 2005-09-06

<160> 44

<210> 1
 <211> 7299
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 1
 agatcctaca aggtagaatc cgcttgagtc gcaaggggtga cttcgccctat attggacgac 60
 ggcgcgcaga gggcgacctc tttttgggtt acgattgtag gattatcact aaaacaatac 120
 atgaacatat tcaaatggca atctctctaa ggcattggaa ataaatacaa ataacagttg 180
 ggtggagttt ttcgacctga gggcggttaac cttctgttaa cctaaaagct cttgccccaa 240
 cagcagaatc ggcgctaatt gccagcggcg gaacttttcc agtttcgcga aaaatatcgc 300
 cactggcaag gaatgggttt gagatggcga agtctgtcct aaaagcagcg cctgtagttg 360
 tagggttgac ggccttgatg gagcgtcatg ccgatgccct ctcgagccaa cttcaagcac 420
 atcatcttaa ggttttcccc ccgcattccg agaagggcat tcgaacattc gggccatcgg 480
 aggcgtccaa gctgctcggc gttggcgagt catatttacg gcagaccgcg tctgagatgc 540
 cagagttgaa tgtagcatg agcccggttg gcaggcgaat gttctcaatt gaagatatcc 600
 atgtgattcg gaagtatatg gatcaggtcg gccgcgggaa ccggcgctac ctgccacatc 660
 gtcgaggcgg cgagcagctt caggttatct ctgtgatgaa tttcaaaggt gggtcgggta 720
 agaccaccac cgccgcgcat ctggcgagcgt acctcgctat gcgcggatat cgagtcttgg 780
 ccattgatct cgatcctcaa gcgagccttt ctgcactctt tgggagccaa ccggagacgg 840
 acgttggccc gaacgaaacg ctctacggcg ctataaggta tgatgatgag caggtggcaa 900
 tcgaacgagt cgtccgaggg acttacattc ccgacctcca cctgattcct ggtaaccttg 960

agctgatgga gtttgaacac gatacgccac gcgcgctgat gaaccgcaaa gagggcgaca 1020
 cgctctttta tggtcgcata agccaagtaa ttgaagatat cgcgataac tatgacgtcg 1080
 tggtcacga ctgccctccc cagcttgggt atctcacgt atccgcattg actgcggcga 1140
 cgtccattct tgtcacggtc catcgcaga tgctggatgt gatgtcgatg aaccagtttc 1200
 tggcaatgac atcgaacctt ttgcgtgaaa tcgagaatgc tggcgccaag ttcaagttta 1260
 attggatgcg ctatctgata acccgtttcg aaccgagcga cggaccacag aaccaaattg 1320
 taggttatct gcggtcgatt tttggcgaaa atgtcctcaa tttccgatg cttaaaacca 1380
 ccgcggtttc ggacgctggc ctgacaaaacc agactctatt cgaagtggag cgtggcctgt 1440
 tcacgcgctc gacctatgat cgagccttg aggcgatgaa cgccgtcaac gacgagatcg 1500
 aaacactgat caaaaaagca tggggtaggc ccacatgagc cggaagcaca tccttggcgt 1560
 ctcaactgac gcccttgaga cgtcgccgc cgacaatagg acggcaaaga accgctccat 1620
 gccgctctc ggcgtaacaa ggaaggagcg cgatcggca acgaagctca cagcgaacat 1680
 tggtaacgca ctgcgagagc aaaacgatcg tcttagccgt gccgaagaga tcgagcggcg 1740
 tctcgctgaa ggtcaggcag tgatagagtt ggatgcctcg tcaatagaac cgtctttcgt 1800
 gcaggatcgt atgcgagggg acattgacgg gctccttact tcgatccggg aacaaggaca 1860
 gcaagtccca atccttgtgc gaccgcatcc gagccagccg ggccgatatc aggttgccct 1920
 cggccaccgc cggctacgcg ccgtttcaga actcggactt ccggtcagag cggtcgttcg 1980
 cgaactgacg gacgagcaag tggtcgtagc acagggtcag gaaaacaatg agcgcgaaga 2040
 tcttaccttc atcgaaaagg cgcgcttcgc acatcgctg aacaggcagt tttctcgaga 2100
 gattgtcatc gccgcgatgt cgatcgacaa gagcaatttg tccaagatgc ttctgctcgt 2160
 cgacgccctc cctctgaac tgaccgatgc tattggtgcc gctcctggtg ttggacggcc 2220
 gagttggcaa caacttgccg agctgattga gaaagtttct tcaccggccg acgtggctaa 2280
 atatgctatg tcggaggaag ttcaagcgt gccatcggca gaacgattca aggcggtgat 2340
 cgctagtctg aagcccagtc gggttgcgcg tggacttccc gaggtcatgg ccaccccgaga 2400
 cggcaccaga attgcacagg tgacgcagag caaggccaaa ctggaaatca cgattgacag 2460
 gaaggcgacg cccgattttg cgaccttcgt gctcgatcat gtgccagcgc tgtatcaagc 2520
 gtaccacgct gagaaccaac ggaaacgggg agagtaaacc gaaaagaaa agagccccct 2580
 caacgtcgcc gtcgcggaag cccttctgtc tctctagcgc gaacagaatc gcatttcctc 2640

gaatcctcgt caagagtttt tagcgccgtt ttggtgagct gatttccttt gcctgctgaa 2700
 aggtgaaaga tgatgcagac aggaagtgt aacgacccat tcgggcggcg gccaatgacg 2760
 cttgcgcttg tgcggcgcca gacggcgctg gccgatatca aacaaggcaa gacagcggaac 2820
 aagtggaagg tcttttagaga cgcgtccgcg gccatggaac tacttggaat ccagtccaac 2880
 agtcttgccg tccttgatgc gctattgagc ttccacccgg aaacggagtt gcgtcaggag 2940
 gcacagctga tcgtcttccc gtcgaatgct cagcttgccc ttcgggcgca tgggatggct 3000
 ggcgcgactt tgcgtaggca catcgccatg ctcggtgagc caggcttgat cgtccggaag 3060
 gatagcgcca acggaagcg ttacgctcgt aaggatggcg ctggtcagat cgagcgcgcg 3120
 tttggcttcg atttgtctcc gcttctcgcg cggccgaag agctagcgat gatggcacag 3180
 cagggtgatgg ccgatcgagc agcattcagg atggccaaag aaagtctgac gatttgccga 3240
 cgggacgttc ggaagctaatt tacggcagct atggaagagg gagcggaggc cgactggcaa 3300
 gctgtcgagg aagtctatgt ggaacttgtg ggtagaattc cacgcgcccc gacgcttgct 3360
 gatgtagagt caattctcga agagatgtgg atgctccagg aagagataat caaccggttg 3420
 gaaattagag acaattcaga aaataatagc accaatgctg ccagagcgca gcagcacata 3480
 cagaattcaa aaccggaatc cgttaatgaa cttgaacctc gctctgaaaa ggagcagggc 3540
 gctaagccga gtgaaataga ccgggcaagg agcgagccga taaaagcgtt cccctcgagg 3600
 atgatcctga aagcatgccg gaccattggc aattatgggc cgagcgggtg ggttgctagc 3660
 tggcgtgacc tcatgtcggc tgcggtggtg gtccggtcta tgctgggggt cagcccgctg 3720
 gcttaaccaag acgcgtgtga ggcaatggga ccggagaatg cggcagcagc gatggcgctg 3780
 attttgagc gagcgaactt catcaattcg cccgggggct atctccgaga tctgacacgg 3840
 cggagcgagc tcgggaagtt ttcacttggc ccgatgataa tggcgctctt gaaggctagc 3900
 gggcagggga cgttgcggtt tggctagaat tagcgagtat ggagcaggat ggtctgtggt 3960
 cagctgacca cagacctaat aggttgaaaa catgagcgtt ttttgatga tcgacagacc 4020
 atccgattcc cggagtacca agcgtgctct gatgggagcg ataacattac tcaacaagca 4080
 cgaaggcccc atgccgatcg ttgatcgtga aggagagcct gctctacatg cggcggtatt 4140
 ttgccggccg aggcattgtag tcgaggagca ctgcctattt actgcctag gcacaaacgt 4200
 tgactcttgg atcgagctgg cagacaaagc aataaccac acagaggacg attaattggc 4260
 gacgaagaga tcagaatcc gccggacggt actgctgctg ccgaagttga gccggctgct 4320
 cctagaggta gaagagcaaa gaaagcacca gccgaaacag cccgcacggg atcgttcaaa 4380

tccgtgaagc cgaaaaccg cggcctcagc aaccgagaaa aactggagaa gatcgggtcaa 4440
 atcgaagctc aggtcgctgg cggcgcaacc ttgaaggacg ccgttaagat cgtgggtatt 4500
 tccgttcaga cctattatca atggaagaga gctgcggttc aacctgtctc acagaatccg 4560
 gccgtgtctg tttcagttga cgatgaactc ggcgagttca tccaactcga ggaggaaaat 4620
 cggcggctca gaaagctagc ttctctctga aaaattgcgc gcagaaaacg cggacttacg 4680
 caaaagactt ggaatcaact agcggccttt gggggtcctt cgctaaatca acttgacgcg 4740
 catctctcaa tgaatgaatg ctttggaata tttccgcgca ttctgatcgt tgcgctatca 4800
 agcaatccca atcttctggc atatgaaaaa accacgaccc aaattcgtcg tcgaatataa 4860
 gacgaacagg cgacaagcca aggcccgacc aacgtcaatc tggggcaatc tgggtttgca 4920
 ggcggtgggc cgtgcggtcg cggccgacgg agtcgtgccg aagagtagtc tgccgcaagt 4980
 ccgttccgtc ctggagaagg ttgtcgcgtc caaggttacc gtcgtggtcc ctcggtgctg 5040
 ccagggtttt aggaagagct tgccgctatc gaggcggaat accgtcgtct gaagcgcctc 5100
 ttgatcgtga agctccgtga ggagaacgac aggccttaagt tcgcgcttcg acgatttggg 5160
 ggcgcctgag cacgatgctg gccacttgc ttcagcgggc aaacaacatg gaggggagat 5220
 ctaatgatcg cggcgcttga acatcgctag gggctcttcg cgcgctgaa ccgtgctcca 5280
 ttttgcactc ggagacacag cctcccaaaa acctggcgcc gctcgttggt gaactcctca 5340
 acatcgagcg gatcaaggga aactggaatg acatccttcg acccgtcacg gcgatccgct 5400
 ctggccaggt ccaacctacg gccatgcccg caaagccaac ggcatttcca cgtcaagcac 5460
 attgaccac tcggctgacg gtacatcagc tggcgagctc atccggaccc agacgaactg 5520
 cgttgatctc aggccgttgc ggcagaaaac ctccatcctc gcagccgatc caaacctttc 5580
 ctgtggtaat gcctatttca gatgaaacag ccttttttaa acttggcgcg tcattctgat 5640
 attatggcca cacctctacg atctagggag tgcgagaagt ggaaagaaat gaagaacccg 5700
 atttgacac acatacctcg atgcggaata aaaatgcac atcgcttggt gaggccctgg 5760
 atgacgatgc gatcgccaac atcgcgcatc acattgttac agacgacccg gtggaaacgt 5820
 caaaaaactt caaaaaactt aagctgatta acaaatcagt gaaacagggt ttcgaacgca 5880
 gtgcgtacgg aaaattccat cgacgcatta gccggcttgg tattgctagt aaggcgctat 5940
 atgacaacgc tgtgccgaag gaaggattcg tagaacatcc tgaatatgct ccagctctgc 6000
 aaagggatta tgcgttggca ggagagcgaa ttgaggcggt tggtggaact ttcagggttc 6060

aaacacctca gcggaaccg gctctttag atcatatctt gagtatgcc gaagggttcg 6120
 atcaagctca tgcccttgag tctatagccc ctcatgttgg cgatctaagc gcggaagatc 6180
 gccatcgtgt tgtgaacaaa atgctcgagc actttgccac cccgtttcaa gaaggggggc 6240
 tgccaaccga cgaaaatfff tgtggaacgt acgctttgtc caaggcggtt cctcatatgg 6300
 aagacagcct aaaagcaaag atgctggatg tgggtgtaga gcacctcac ttagccaacc 6360
 tccattggac gcagagagaa ctagttgaag ggtggcatca agaccgtgaa gctgagaagt 6420
 cagcctggcg ttccaatcaa aagccaattg tcgaggggag acttgacagc ctggaacgat 6480
 cgatccacag tgatatcgag gtgacaaaca ggagtgattt tgcgaggatg cgttcagcca 6540
 ggcccttgca acaagctata agcgatacgt tcgatcttgc gcgtgaggag ctcaaaagcc 6600
 gccctcgtga agggcggggt cgataattac atctattggt ctttctgccc aacctctatg 6660
 aaatccgcac gtcaaatgtg gcttttactt cccgatttca attgaagcgc taagctgaaa 6720
 atcccgctcc catttctgac ctaacgggtt catcacgggg gcagggagcg gcgcttaaaa 6780
 cggtgacggc caccaccaa ggacatgttc gctcacggcg tgcctccgtg cttctttgca 6840
 agagcctgct tcaggctgat gatctccttc agtgcggttg tgtgaatccg ctccaggcgt 6900
 ttcagttcgc tctccaaata ggcggtgccc ttatccagcc tcgtccgatc ttcttccaag 6960
 ctctccatff tcaactagcgc gttatggtaa ttcaaccgta actcctcaa aaaagcacgt 7020
 tcggcgacga aatgggtttc ggaatcgagt tcaggatgtg cgcgcacatg cagcagcga 7080
 accgccttgc cggcagcggc gagccgggag cggtgaagcgc gttgaatttc cgcttgggtc 7140
 agcgcgtttg gcttgcgggg ccgcgaggaa atttgggagt aaccataacg gttatttatc 7200
 ataacgcgtt atcactggat agcatcgggc caggcggatg gcgcgcttcg ccgggtcgaa 7260
 atcaatattt ccagatcgag atggattgaa gacctgaag 7299

<210> 2
 <211> 5617
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 2
 agatcctaca aggtagaatc cgcttgagtc gcaagggtga cttcgcttat attggacgac 60
 ggcgcgacga gggcgacctc tttttgggtt acgattgtag gattatcact aaaacaatac 120
 atgaacatat tcaaatggca atctctctaa ggcattggaa ataaatacaa ataacagttg 180
 ggtggagttt ttcgacctga gggcggttaac cttctgttaa cctaaaagct cttgcccaca 240

cagcagaatc ggcgctaatt gccagcggcg gaacttttcc agtttcgcga aaaatatcgc 300
 cactggcaag gaatgggttt gagatggcga agtctgtcct aaaagcagcg cctgtagttg 360
 tagggttgac ggccttgatg gagcgcatg ccgatgccct ctcgagccaa cttcaagcac 420
 atcatcttaa ggttttcccg ccgcattccg agaagggcat tcgaacattc gggccatcgg 480
 aggcgccaa gctgctcggc gttggcgagt catatttacg gcagaccgcg tctgagatgc 540
 cagagttgaa tgtagcatg agccgggtg gcaggcgaat gttctcaatt gaagatatcc 600
 atgtgattcg gaagtatatg gatcaggctg gccgcgggaa ccggcgctac ctgccacatc 660
 gtcgaggcgg cgagcagctt caggttatct ctgtgatgaa tttcaaaggt gggtcgggta 720
 agaccaccac cgcgcgcgat ctggcgagcgt acctcgctat gcgcggatat cgagtcttgg 780
 ccattgatct cgatccctaa gcgagccttt ctgcactctt tgggagccaa ccggagacgg 840
 acgttggccc gaacgaaacg ctctacggcg ctataaggta tgatgatgag caggtggcaa 900
 tcgaacgagt cgtccgaggg acttacattc ccgacctcca cctgattcct ggtaaccttg 960
 agctgatgga gtttgaacac gatacgccac gcgcgctgat gaaccgcaa gagggcgaca 1020
 cgctctttta tggctgcctc agccaagtaa ttgaagatat cgcggataac tatgacgtcg 1080
 tggtcacga ctgccctccc cagcttgggt atctcacgct atccgcattg actgcggcga 1140
 cgtccattct tgtcacggtc catccgcaga tgctggatgt gatgtcgatg aaccagtttc 1200
 tggcaatgac atcgaacctt ttgcgtgaaa tcgagaatgc tggcgccaag ttcaagtta 1260
 attggatgcg ctatctgata acccgtttcg aaccgagcga cggaccacag aaccaaatgg 1320
 taggttatct gcggtcgatt tttggcgaaa atgtcctcaa ttttcgatg cttaaaacca 1380
 ccgcggttcc ggacgctggc ctgacaaacc agactctatt cgaagtggag cgtggcctgt 1440
 tcacgcgctc gacctatgat cgagccttgg aggcgatgaa cgcgctcaac gacgagatcg 1500
 aaacactgat caaaaaagca tggggtaggc ccacatgagc cggaagcaca tccttggcgt 1560
 ctcaactgac gccctgaga cgtcgccgcg cgacaatagg acggcaaaga accgctccat 1620
 gccgctcctc ggcgtaacaa ggaaggagcg cgatccggca acgaagctca cagcgaacat 1680
 tggtaacgca ctgcgagagc aaaacgatcg tcttagccgt gccgaagaga tcgagcggcg 1740
 tctcgctgaa ggtcaggcag tgatagagtt ggatgcctcg tcaatagaac cgtctttcgt 1800
 gcaggatcgt atgcgagggg acattgacgg gctccttact tcgatccggg aacaaggaca 1860
 gcaagtccca atccttgtgc gaccgcatcc gagccagccg ggccgatatc aggttgcctt 1920

cggccaccgc cggctacgcg ccgcttcaga actcggactt ccggtcagag cggtcgttcg 1980
 cgaactgacg gacgagcaag tggtcgtagc acagggtcag gaaaacaatg agcgcgaga 2040
 tcttaccttc atcgaaaagg cgcgcttcgc acatcgctg aacaggcagt tttctcgaga 2100
 gattgtcatc gccgcgatgt cgatcgacaa gagcaatttg tccaagatgc ttctgctcgt 2160
 cgacgccctc ccctctgaac tgaccgatgc tattgggtgcc gctcctgggtg ttggacggcc 2220
 gagttggcaa caacttgccg agctgattga gaaagtttct tcaccggccg acgtggctaa 2280
 atatgctatg tcggaggaag ttcaagcgct gccatcgga gaacgattca aggcgggtgat 2340
 cgctagtctg aagcccagtc gggttgcgcg tggacttccc gaggtcatgg ccaccccaga 2400
 cggcaccaga attgcacagg tgacgcagag caaggccaaa ctggaaatca cgattgacag 2460
 gaaggcgacg cccgattttg cgaccttcgt gctcgatcat gtgccagcgc tgtatcaagc 2520
 gtaccacgct gagaaccaac ggaaacgggg agagtaaacc gaaaagaaa agagccccct 2580
 caacgtcgcc gtcgcggaag cccttctgtc tctctagcgc gaacagaatc gcatttcctc 2640
 gaatcctcgt caagagtttt tagcgccgtt ttggtgagct gatttccttt gcctgctgaa 2700
 aggtgaaaga tgatgcagac aggaagtgt acgacgccat tcggggcgcg gccaatgacg 2760
 cttgcgcttg tgcggcgcca gacggcgctg gccgatatca aacaaggcaa gacagcggac 2820
 aagtggaagg tcttttagaga cgcgtccgcg gccatggaac tacttggaat ccagtccaac 2880
 agtcttgccg tccttgatgc gctattgagc tttcaccgga aaacggagtt gcgtcaggag 2940
 gcacagctga tcgtcttccc gtogaatgct cagcttgccc ttcggggcgca tgggatggct 3000
 ggcgcgactt tgcgtaggca catcgccatg ctcgtggagt caggcttgat cgtccggaag 3060
 gatagcgcca acggaaagcg ttacgctcgt aaggatggcg ctggtcagat cgagcgcgcg 3120
 tttggcttcg atttgtctcc gcttctcgcg cggtcggaag agctagcgat gatggcacag 3180
 caggatgatg ccgatcgagc agcattcagg atggccaaag aaagtctgac gatttgccga 3240
 cgggacgttc ggaagctaata tacggcagct atggaagagg gagcggaggg cgactggcaa 3300
 gctgtcgagg aagtctatgt ggaacttggt ggtagaattc cacgcgcccc gacgcttgct 3360
 gatgtagagt caattctcga agagatgtgg atgctccagg aagagataat caaccggttg 3420
 gaaattagag acaattcaga aaataatagc accaatgctg ccagagcgga gcagcacata 3480
 cagaattcaa aaccggaatc cgttaatgaa cttgaacctc gctctgaaaa ggagcagggc 3540
 gctaagccga gtgaaataga cggggcaagg agcgagccga taaaagcggt cccctcgagg 3600
 atgatcctga aagcatgccc gaccattggc aattatgggc cgagcggtgc ggttgctagc 3660

tggcgtgacc tcatgtcggc tgcggtggtg gttcgggtcta tgctgggggt cagcccgtcg 3720
 gcttaccaag acgcgtgtga ggcaatggga ccggagaatg cggcagcagc gatggcgtgc 3780
 attttggagc gagcgaactt catcaattcg cccgggggct atctccgaga tctgacacgg 3840
 cggagcagagc tcgggaagtt ttcacttggc ccgatgataa tggcgtctct gaaggctagc 3900
 gggcagggga cgttgcggtt tggctagaat tagcgagtat ggagcaggat ggtctgtggt 3960
 cagctgacca cagacctaat aggttgaaaa catgagcgtt ttttgatga tcgacagacc 4020
 atccgattcc cggagtacca agcgtgctct gatgggagcg ataacattac tcaacaagca 4080
 cgaaggcccc atgccgatcg ttgatcgtga aggagagcct gctctacatg cggcgggtatt 4140
 ttgccggccg aggcattgtg tcgcggagca ctgcctatct actgccctag gcacaaacgt 4200
 tgactcttgg atcgagctgg cagacaaagc aataaccac acagaggagc attaatggct 4260
 gacgaagaga tccagaatcc gccggacggt actgctgctg ccgaagttga gccggctgct 4320
 cctagaggta gaagagcaaa gaaagcacca gccgaaacag cccgcacggg atcggtcaaa 4380
 tccgtgaagc cgaaaacccg cggcctcagc aaccgagaaa aactggagaa gatcgggtcaa 4440
 atcgaagctc aggtcgctgg cggcgcaacc ttgaaggacg ccgttaagat cgtgggtatt 4500
 tccgttcaga cctattatca atggaagaga gctgcggttc aaactgtctc acagaatccg 4560
 gccgtgtctg tttcagttga cgatgaactc ggcgagttca tccaactcga ggaggaaaat 4620
 cggcgggtca gaaagctagc ttctctctga aaaattgcgc gcagaaaacg cggacttacg 4680
 caaaagactt ggaatcaact agcggccttt ggggggtccct cgctaaatca acttgacgcg 4740
 catctctcaa tgaatgaatg ccttggaaaa tttccgcgca ttctgatcgt tgcgctatca 4800
 agcaatccca atcttctggc atatgaaaaa accacgaccc aaattcgtcg tcgaatataa 4860
 gacgaacagg cgacaagcca aggcccgacc aacgtcaatc tggggcaatc tgggtttgca 4920
 ggcggtgggc cgtgcggtcg cggccgacgg agtcgtgccg aagagtagtc tgccgcaagt 4980
 ccgttccgtc ctggagaagg ttgtcgcgtc caaggttacc gtcgtggtcc ctcggtgctg 5040
 ccagggtttt aggaagagct tgccgctatc gaggcggaaa accgtcgtct gaagcgcctc 5100
 ttgatcgtga agctccgtga ggagaacgac aggettaagt tcgcgcttcg acgatttggg 5160
 ggcgcctgag cacgatgctg gccacttgc ttcagcgggc aaacaacatg gagtggagat 5220
 ctaatgatcg cggcgcttga acatcgctag gggctctcgg cgccgctgaa ccgtgctcca 5280
 ttttgcactc ggagacacag cctcccaaaa acctggcgcc gctcgttggt gaactcctca 5340

acatcgagcg gatcaagggg aactggaatg acatccttcg acccgtaacg gcgatccgct 5400
 ctggccaggt ccaacctacg gccatgcccc caaagccaac ggcattttcca cgtcaagcac 5460
 attgaccac tgggctgacg gtacatcagc tggcgagctc atccggaccc agacgaactg 5520
 cgttgatctc aggcggttgc ggcagaaaac ctccatcctc gcagccgata caacactttc 5580
 ctgtggtaat gcctatttca gatgaaacag ccttttt 5617

<210> 3
 <211> 4115
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 3
 tacaaggtag aatccgcctg agtcgcaagg gtgacttcgc ctatatgga cgacggcgcg 60
 cagagggcga cctctttttg ggttacgatt gtaggattat cactaaaaca atacatgaac 120
 atattcaaat ggcaatctct ctaaggcatt ggaaataaat acaaataaca gttgggtgga 180
 gtttttcgac ctgagggcgt taacctcttg ttaacctaaa agctcttgcc caaacagcag 240
 aatcggcgct aattgccagc ggcggaactt ttccagtttc gcgaaaaata tcgccactgg 300
 caaggaatgg gtttgagatg gcgaagtctg tcctaaaagc agcgctctga gttgtagggg 360
 tgacggcctt gatggagcgt catgccgatg ccctctcgag ccaacttcaa gcacatcatc 420
 ttaaggtttt cccgcgcgat tccgagaagg gcattcgaac attcgggcca tcggaggcgt 480
 ccaagctgct cggcggttggc gagtcattt tacggcagac cgcgtctgag atgccagagt 540
 tgaatgttag catgagcccc ggtggcaggc gaatgttctc aattgaagat atccatgtga 600
 ttcggaagta tatggatcag gtcggccgcg ggaaccggcg ctacctgcca catcgctgag 660
 gcggcgagca gcttcaggtt atctctgtga tgaatttcaa aggtgggtcg ggtaagacca 720
 ccaccgcgc gcactctggc cagtacctcg ctatgcgcgg atatcgagtc ttggccattg 780
 atctcgatcc tcaagcgagc ctttctgcac tctttgggag ccaaccggag acggacgttg 840
 gcccgaaacga aacgctctac ggcgctataa ggtatgatga tgagcaggtg gcaatcgaac 900
 gagtcgtccg agggacttac attcccagacc tccacctgat tcctggtaac cttgagctga 960
 tggagtttga acacgatacg ccacgcgcgc tgatgaaccg caaagagggc gacacgctct 1020
 tttatggctg catcagccaa gtaattgaag atatcgcgga taactatgac gtcgtggtca 1080
 tcgactgcc tccccagctt gggatatctc cgtatccgc attgactgcg gcgacgtcca 1140
 ttcttgtcac ggtccatccg cagatgctgg atgtgatgac gatgaaccag tttctggcaa 1200

tgacatcgaa ccttttgctg gaaatcgaga atgctggcgc caagttcaag ttttaattgga 1260
 tgcgctatct gataaccctg ttcgaaccga gcgacggacc acagaaccaa atggttaggtt 1320
 atctgcggtc gatTTTTTggc gaaaatgtcc tcaattttcc gatgcttaaa accaccgcgg 1380
 tttcggacgc tggcctgaca aaccagactc tattcgaagt ggagcgtggc ctgttcacgc 1440
 gctcgacctg tgatcgagcc ttggaggcga tgaacgccgt caacgacgag atcgaaacac 1500
 tgatcaaaaa agcatggggg aggcccatat gagccggaag cacatccttg gcgtctcaac 1560
 tgacgcccct gagacgtcgc ccgccgacaa taggacggca aagaaccgct ccatgccgct 1620
 cctcggcgta acaaggaagg agcgcgatcc ggcaacgaag ctcacagcga acattggtaa 1680
 cgcactgcga gagcaaaacg atcgtcttag ccgtgccgaa gagatcgagc ggcgtctcgc 1740
 tgaaggctcag gcagtgatag agttggatgc ctctcaata gaaccgtctt tcgtgcagga 1800
 tcgtatgcga ggggacattg acgggctcct tacttcgatc cgggaacaag gacagcaagt 1860
 cccaatcctt gtgcgaccgc atccgagcca gccgggccga tatcagggttg ccttcggcca 1920
 ccgccggcta cgcgccgttt cagaactcgg acttcgggc agagcggtcg ttgcgaact 1980
 gacggacgag caagtggctg tagcacaggg tcaggaaaac aatgagcgcg aagatcttac 2040
 cttcatcgaa aaggcgcgct tcgcacatcg cctgaacagg cagttttctc gagagattgt 2100
 catcgccgag atgtcgatcg acaagagcaa tttgtccaag atgcttctgc tcgtcgacgc 2160
 cctccccctt gaactgaccg atgctattgg tgccgctcct ggtgttggaac ggccgagttg 2220
 gcaacaactt gcgagctga ttgagaaagt ttcttcaccg gccgacgtgg ctaaatatgc 2280
 tatgtcggag gaagttcaag cgctgccatc ggcagaacga ttcaaggcgg tgatcgctag 2340
 tctgaagccc agtcgggttg cgcgtggact tcccgaggtc atggccaccc cagacggcac 2400
 cagaattgca caggtgacgc agagcaaggc caaactggaa atcacgattg acaggaaggc 2460
 gacgcccgat tttgcgacct tcgtgctcga tcatgtgcca gcgtgtatc aagcgtacca 2520
 cgctgagaac caacggaaac ggggagagta aaccgcaaaa gaaaagagcc ccctcaacgt 2580
 cgcgctcgcg gaagcccttc tgtctctcta gcgcgaacag aatcgcattt cctcgaatcc 2640
 tcgtcaagag ttttttagcgc cgttttggtg agctgatttc ctttgctcgc tgaaagggtga 2700
 aagatgatgc agacaggaag tgtaacgacg ccattcgggc ggcggccaat gacgcttgcg 2760
 cttgtgcggc gccagacggc gctggccgat atcaaacaag gcaagacagc ggacaagtgg 2820
 aaggctctta gagacgcgtc cgcggccatg gaactacttg gaatccagtc caacagtctt 2880

gccgtccttg atgcgctatt gagctttcac ccggaacgg agttgctca ggaggcacag 2940
 ctgatcgtct tcccgtcgaa tgctcagctt gcccttcggg cgcattgggat ggctggcgcg 3000
 actttgctga ggcacatcgc catgctcgtg gagtcaggct tgatcgtccg gaaggatagc 3060
 gccaaacggaa agcgttacgc tcgtaaggat ggcgctggtc agatcgagcg cgcgtttggc 3120
 ttcgatttgt ctccgcttct cgcgcggtcc gaagagctag cgatgatggc acagcagggtg 3180
 atggccgatac gagcagcatt caggatggcc aaagaaagtc tgacgatttg ccgacgggac 3240
 gttcgggaagc taattacggc agctatggaa gagggagcgg agggcgactg gcaagctgtc 3300
 gaggaagtct atgtggaact tgtgggtaga attccacgcg ccccgacgct tgctgatgta 3360
 gagtcaattc tcgaagagat gtggatgctc caggaagaga taatcaaccg gttggaaatt 3420
 agagacaatt cagaaaataa tagcaccaat gctgccaga gcgagcagca catacagaat 3480
 tcaaaacccg aatccgttaa tgaacttgaa cctcgctctg aaaaggagca gggcgctaag 3540
 ccgagtgaac tagaccgggc aaggagcgag ccgataaaag cgttccccct cgggatgatac 3600
 ctgaaagcat gcccgaccat tggcaattat gggccgagcg gtgcggttgc tagctggcgt 3660
 gacctcatgt cggctgcggt ggtgggtcgg tctatgctgg gggtcagccc gtcggcttac 3720
 caagacgcgt gtgaggcaat gggaccggag aatgcggcag cagcgatggc gtgcattttg 3780
 gagcgagcga acttcatcaa ttcgccggg ggctatctcc gagatctgac acggcggagc 3840
 gagctcggga agttttcact tggcccgatg ataatggcg tcttgaaggc tagcgggcag 3900
 gggacgttgc ggtttggcta gaattagcga gtatggagca ggatggtctg tggtcagctg 3960
 accacagacc taatagggtg aaaacatgag cgttttttgg atgatcgaca gaccatccga 4020
 ttcccgagat accaagcgtg ctctgatggg agcgataaca ttactcaaca agcacgaagg 4080
 ccccatgccg atcgttgata gtgaaggaga gcctg 4115

<210> 4
 <211> 4304
 <212> DNA
 <213> Rhizobium etli

<400> 4
 agttacggct gatcgaccag acccggcacc ttaccgcccgc gcccgcgtcc atccacgcca 60
 gcgaaccgat gccttgcatc tgccgggctt cagcaaggcg ctttgcacgc ccgacattgc 120
 gattcggatt atactgctgc tgttcccggc cggctctgctc cgattcggcc tgtgaatgtg 180
 cgattgctgg acccgccagc ggcacgcccg gccggcgcaa gcgcttgaaa tagactggac 240

aaccttttga taggatcttg ttaacctat ttgccttgcc acccctccag aatcggcgct 300
 aaatgcgggtt tcaaagcgcg tagagctttt aaatcgcatc ttcgagattt ccatgaatat 360
 ggcaccgcaa atagaaaaag caatttccga tgcgaccag ctgatcatcg gtcaggcaca 420
 ggaactatcc gacaagctga agcagcatcg cctcgaaatg tttcctccgc gcgcgctaaa 480
 gggctctgcg gaatttcagc ttgctgaagt ggcgcgggtt ctcggcgtga ccagcggcta 540
 tcttcgaaat ctttcgctcg agggcaaggg tgccctcccc caggttacgc cgtctggcgg 600
 ccgatcgtat acggcgggagc agatggagga gatgcgtggc tttctcgagc ataatgcgcg 660
 cgccggaaca cattatgtgc gtcacgcccg cgcccaagaa catctgcagg tcgttgctgt 720
 cgtcaacttc aaggggggca gcggcaagac gacgagtgc gcgcaccttg cccagcatct 780
 cgccctgacc ggtcaccgcg tcttgccgt cgatctcgat ccgcaagcgt ctctttctgc 840
 catacaggc tttcagccg agttcgacgt caacgaaaac gagacactct acgccgccat 900
 tcgctatgac gatcagcggc gtccgctcgc ggacattatc cgcccgacca acttcccgaa 960
 ccttcacctc gtgcggggca atctgaaact gatggaattc gagcacgata cgccgcgggg 1020
 cctcgctcag ggcaaagcga gcgattatgg gcgcgtcttc tttgcccggc tggatgaggc 1080
 gctggcctcg gtcgcgcatg attacgacgt cgtcatcatc gattgcctc cccagcttgg 1140
 ctttttgacc atgagcgcca tttgcggtgc gacggcggtt ctgatcaccg ttcacccgca 1200
 gatgctcgat gtcattgtca tgtgccagtt cctgcaaatg cttggcgaag tgctgaacac 1260
 gctgaaggga gccggcgga atatgaacct cgactggctg cgttacctg tgacccgcta 1320
 cgatccgcag gacggggcgc agacgcagat ggtcgcttc atgcgctcga tgttcaagag 1380
 ccatgtgctc accaaccgca tgctgcgcag cgctcgcatc tccgatgcgg cgatgactaa 1440
 ccagacgctg tacgaagtcg agcgaagtca gtttaccgc gcgacctatg accgcgccat 1500
 ggaggcgatg gagtcagtca acacggaaat cgtcgatctc atccataagg catggggcgg 1560
 gaaatgagcg ggaagtttac tgcggtaaac cggggcaagg agctggttga tggcgcgtaa 1620
 aaatcttctg tcgggcctga tggacgattc caagaagttt actgcggtaa acaatgagga 1680
 tgagccggcc cctcgcgacg agaggcagca tatcacctat aaggggattg gcgcgctcgg 1740
 tgcggtcacc cgcagcatcg atgccttggc cgccaaggcc gatgccgcca aggcgatcga 1800
 agagcagctg gcgagcggcg agacggtgat cgatctcgac ccggcgctga tcgaagattc 1860
 ctctgtgacc gaccggctgg cgcatactga cgaacagttc cgggaattag tcgaggcgat 1920

ccgcctgcgc ggccaggatc caccgatcct tgtgcgccc catcccgaga gggaggggcg 1980
 atatcagatc gcttttggtc atcgtcgtgc gcgggcggca aaggagctcg gccgacctgt 2040
 ccgggcggtg gtcaagagac tcgacgaccg cgaccatgtc attgcgcagg gccaggagaa 2100
 ttcgaattcg gcacgcgccg atctctcctt catcgagagg acgatgtttg ccgacaagct 2160
 cgacacgttg ggtttcgacc gggaaacgat catgtcggca ctcagcgcag acaagacgac 2220
 ggtgtccaag atgctgtcgg tcacgaagcg gattccggcc gaagtccctg ccgcgatcgg 2280
 cgtagccaag acgactggcc gcgatcgtg gcatgatctt tcggcgaaat tcgagacgga 2340
 aaacatcgca gcccgggcga ttgagttcac cagatcgggt gagttcgaga cggccgagcc 2400
 ggacgcccgc ttcgacatgc ttgtgcctt catcagcagg aaccaacagg cgtgcgccgc 2460
 cgccgcagtt cagcccggtg cgcacgcctg gcagcgccgg gacggagccg tcaaagcgaa 2520
 gatcaaggat gatggaaaac agttcaccat cgcgctgaag gcggagaagg catctgcctt 2580
 tggcgctac atcgccagca atctggatcg tctctacgag gcgttcgaga agacacagga 2640
 tttgacgaag aacggagatc aataagcaaa agaaaaggcc cccgaacgtt gccgtcgcgg 2700
 aagccctctc tgatctagac acccagagaa tcacatttcc gcgaatcata gtcaagagtc 2760
 tttggcaccg aatttggtga ggcgtgatct tttgccttga agaaggcgaa gaaaatggaa 2820
 agcggaaagt tgacacgccc ttcgggcggc ggccgatgac gtttggcatg ttggcaagt 2880
 aggcgcgtgc ccgaaaaatc gagcccgcc gatcgattga taaatggaaa ctctatcgcg 2940
 ccctgtgcga ggccaggccg ctgctcggca ttacagaccg ggcgctttcc atcctgaacg 3000
 ccttgctgag cttttatccc aaggagagc tctccgagga gaacggcttg gtcgtatttc 3060
 cttcgaatac gcagctctct ctgcgcgcgc atggaatggc ggagcagacg atccgtcgcc 3120
 acctggcggc gctgatcgag gccggattgc tgatccgcaa ggacagccc aacggcaagc 3180
 gttacgctcg caaggagcag ggcggggaga tccgtgaggc attcggcttc tcgctggcgc 3240
 cgctgcttgc gcgcgcggac gagatcgagc ggctggcggc cgagatggca gccgaacgat 3300
 tgcagctgca gcggctcaaa gagcgctga cgctttgcag gcgcgacatc gccaaagctca 3360
 tcgagatggc cgtggaagag ggcgcctctg gtgattggag cggggtccac ctgcattttc 3420
 gaggcatcgt cgaacggctg ccgcgctcgc catccttcga gaagattgcc gccgactcgc 3480
 acgaactgga actgttgccg gaagaaatca ccaatcagtt ggaaatgcag gttaaagctc 3540
 caaatcaaag cggcaatgcc caacattctg agcggcacat acagaattca aaccacact 3600
 acactactga acttgaacca cgcttcgaaa cgaagcaggg cgcaacggtg gacgaccaat 3660

cggaaggttg ggccgagccg agggccagaa tagcgacaca ggaggggaag ggcaggccca 3720
 tgccagctgc aaactcagcc tcggttgccg gcggcgggct caaatccttc ccgctgggcc 3780
 tgggtgctgca ggccctgcca gagatcgccg cctatggacc gcagggctcg gtgggcacat 3840
 ggcgcgatct gatggcgccg gctgtcgtcg tgcgctcaat gctcggagtg agccctcgg 3900
 cctatgaaca ggccctgcgag gtcatggggc ctgaaaaatgc ggctaccgtc atagcgtgcg 3960
 tgcttgaaag ggcagggcac atcaattccg ccggtgggta cctccgtgac ctgaccgcgc 4020
 gcgcccagag aggcgaattt gccatcgga ccatgttgat ggcgcttgtc cgcaccaatt 4080
 cgccaatcag aggcgaagacc ggatgaaaaa ttcgtgtca tctgtccgtg gcgatctatg 4140
 gttaacgaaa ggtgacggaa ataaacaggg tgataacttc ttgttaggat attcttcctt 4200
 tgagatcatg aagttacaag atttttgatt ggcaaggcga gggaaggacc tgatcgacga 4260
 tcggccggcg ttcgctggag aaacggtgcg gttggagttg acgt 4304

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 5

cacgtgtaca aggtagaatc cgccctgag 28

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 6

gtatacaggc tctccttcac gatcaac 27

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador Sintético

<400> 7

agcttgggcc cctcgaggct agcactagtg 30

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador Sintético

<400> 8

gatccactag tgctagcctc gaggggccc		29
<210>	9	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Descrição da Seqüência Artificial: Iniciador Sintético	
<400>	9	
ccacgtgagt tacggctgat cgaccagac		29
<210>	10	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Descrição da Seqüência Artificial: Iniciador Sintético	
<400>	10	
gcttaggacg tcaactccaa cgcaccgt		29
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Agrobacterium rhizogenes	
<400>	11	
acaaggtaga atccgcctga g		21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Agrobacterium rhizogenes	
<400>	12	
ttcaactctg gcatctcaga c		21
<210>	13	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	Agrobacterium tumefaciens	
<400>	13	
tcgctttcct tgaaggagg ttcttccaga cggttcatca cgg		43
<210>	14	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Descrição da Seqüência Artificial: Iniciador Sintético	

<400>	14		
		gtaggtgatt ggcgttg	17
<210>	15		
<211>	44		
<212>	DNA		
<213>	Agrobacterium tumefaciens		
<400>	15		
		tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gact	44
<210>	16		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Descrição da Seqüência Artificial: Iniciador Sintético		
<400>	16		
		gttatttatg agatgggttt ttatga	26
<210>	17		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Escherichia coli		
<400>	17		
		aacgcctgat tttagcgag	20
<210>	18		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Escherichia coli		
<400>	18		
		caataccgca gggcacttat c	21
<210>	19		
<211>	18		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Descrição da Seqüência Artificial: Iniciador Sintético		
<400>	19		
		cccacagatg atgtggac	18
<210>	20		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Agrobacterium rhizogenes		
<400>	20		

tggcaaggaa tgggtttgag 20

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 21

ctacaactac aggcgctgct ttt 23

<210> 22
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador Sintético

<400> 22

tggcgaagtc tgtcc 15

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 23

gcccaaggat ctttttggaa t 21

<210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 24

ccacccaaac gtcggaaa 18

<210> 25
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador Sintético

<400> 25

tgctccgctcg tcagg 15

<210> 26
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 26

gcacccggtg gagctt 16

<210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 27

tctgcctaac cggctcagt 19

<210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador Sintético

<400> 28

catgttggtt totacgcag 19

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

<400> 29

atgaaataaa aggatgcaca cat 23

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

<400> 30

acaactttga tgccacatt 20

<210> 31
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador Sintético

<400> 31

tgacatgcta atcac 15

<210> 32
 <211> 1215
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 32

atggcggaagt ctgtcctaaa agcagcgcct gtagttgtag ggttgacggc cttgatggag 60
 cgtcatgccg atgccctctc gagccaactt caagcacatc atcttaaggt tttcccgccg 120
 cattccgaga agggcattcg aacattcggg ccatcggagg cgtccaagct gctcggcggt 180
 ggcgagtc atttacggca gaccgcgtct gagatgccag agttgaatgt tagcatgagc 240
 ccgggtggca ggcgaatgtt ctcaattgaa gatatccatg tgattcggaa gtatatggat 300
 caggtcggcc gcgggaaccg gcgctacctg ccacatcgtc gaggcggcga gcagcttcag 360
 gttatctctg tgatgaattt caaagggtggg tcgggtaaga ccaccaccgc cgcgcatctg 420
 gcgcagtacc tcgctatgcg cggatatcga gtcttggcca ttgatctcga tcctcaagcg 480
 agcctttctg cactctttgg gagccaaccg gagacggacg ttggcccgaa cgaaacgctc 540
 tacggcgcta taaggatga tgatgagcag gtggcaatcg aacgagtcgt ccgagggact 600
 tacattcccg acctccacct gattcctggg aaccttgagc tgatggagtt tgaacacgat 660
 acgccacgcg cgctgatgaa ccgcaaagag ggcgacacgc tcttttatgg tcgcatcagc 720
 caagtaattg aagatatcgc ggataactat gacgtcgtgg tcatcgactg ccctcccag 780
 cttgggtatc tcacgctatc cgcattgact gcggcgacgt ccattcttgt cacgggtccat 840
 ccgcagatgc tggatgtgat gtogatgaac cagtttctgg caatgacatc gaaccttttg 900
 cgtgaaatcg agaatgctgg cgccaagttc aagtttaatt ggatgcgcta tctgataacc 960
 cgtttcgaac cgagcgacgg accacagaac caaatggtag gttatctgcg gtcgattttt 1020
 ggcgaaaatg tcctcaattt tccgatgctt aaaaccaccg cggtttcgga cgctggcctg 1080
 acaaaccaga ctctattcga agtggagcgt ggctgttca cgcgctcgac ctatgatcga 1140
 gccttggagg cgatgaacgc cgtcaacgac gagatcgaaa cactgatcaa aaaagcatgg 1200
 ggtaggccca catga 1215

<210> 33
 <211> 939
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 33
 atgccgctcc tcggcgtaac aaggaaggag cgcgatccgg caacgaagct cacagcgaac 60
 attggtaacg cactgcgaga gcaaaacgat cgtcttagcc gtgccgaaga gatcgagcgg 120
 cgtctcgctg aaggtcaggc agtgatagag ttggatgcct cgtcaataga accgtctttc 180
 gtgcaggatc gtatgcgagg ggacattgac gggctcctta cttcgatccg ggaacaagga 240
 cagcaagtcc caatccttgt gcgaccgat ccgagccagc cgggccgata tcaggttgcc 300

ttccggccacc gccggctacg cgcggtttca gaactcggac ttccggtcag agcggtcggt 360
 cgcgaaactga cggacgagca agtggtcgta gcacagggtc aggaaaacaa tgagcgcgaa 420
 gatcttacct tcatcgaaaa ggcgcgcttc gcacatcgcc tgaacaggca gttttctcga 480
 gagattgtca tcgccgcgat gtcgatcgac aagagcaatt tgtccaagat gcttctgctc 540
 gtcgacgccc tccccctctga actgaccgat gctattgggt cgcgtcctgg tgttggaagg 600
 ccgagttggc aacaacttgc cgagctgatt gagaaagttt cttcacggc cgacgtggct 660
 aaatatgcta tgtcggagga agttcaagcg ctgccatcgg cagaacgatt caaggcggtg 720
 atcgctagtc tgaagcccag tcgggttgcg cgtggacttc ccgaggtcat ggccacccca 780
 gacggcacca gaattgcaca ggtgacgcag agcaaggcca aactggaaat cagcattgac 840
 aggaaggcga cgcgcgattt tgcgacctc gtgctcgatc atgtgccagc gctgtatcaa 900
 gcgtaccacg ctgagaacca acggaaacgg ggagagtaa 939

<210> 34
 <211> 1218
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 34
 atgatgcaga caggaagtgt aacgacgcc ttccggcgcc ggccaatgac gcttgcgctt 60
 gtgcggcgcc agacggcgct ggccgatatc aaacaaggca agacagcgga caagtggaag 120
 gtcttttagag acgcgtccgc ggccatggaa ctacttgga tccagtccaa cagtcttgcc 180
 gtccttgatg cgctattgag ctttcacccg gaaacggagt tgcgtcagga ggcacagctg 240
 atcgtcttcc cgtcgaatgc tcagcttgcc cttcgggcgc atgggatggc tggcgcgact 300
 ttgcgtaggc acatcgccat gtcctggag tcaggcttga tcgtccggaa ggatagcgcc 360
 aacggaaagc gttacgctcg taaggatggc gctggtcaga tcgagcgcg cgttggttc 420
 gatttgcttc cgcttctcgc gcggtccgaa gagctagcga tgatggcaca gcaggatgatg 480
 gccgatcgag cagcattcag gatggccaaa gaaagtctga cgatttgccg acgggacgtt 540
 cggaagctaa ttacggcagc tatggaagag ggagcggagg gcgactggca agctgtcgag 600
 gaagtctatg tggaacttgt gggtagaatt ccacgcgccc cgacgcttgc tgatgtagag 660
 tcaattctcg aagagatgtg gatgctccag gaagagataa tcaaccggtt ggaaattaga 720
 gacaattcag aaaataatag caccaatgct gccagagcg agcagcacat acagaattca 780
 aaacccgaat ccgttaatga acttgaacct cgctctgaaa aggagcagg cgctaagccg 840
 agtgaaatag accgggcaag gagcgagccg ataaaagcgt tccccctcgg gatgatcctg 900
 aaagcatgcc cgaccattgg caattatggg ccgagcggtg cggttgctag ctggcgtag 960

ctcatgtcgg ctgcggtggt ggttcggtct atgctggggg tcagcccgtc ggcttaccaa 1020
 gacgcgtgtg aggcaatggg accggagaat gcggcagcag cgatggcgtg cattttggag 1080
 cgagcgaact tcatcaattc gcccgggggc tatctccgag atctgacacg gcggagcagag 1140
 ctcgggaagt tttcacttgg cccgatgata atggcgctct tgaaggctag cgggcagggg 1200
 acgttgccgt ttggctag 1218

<210> 35
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 35
 gccggaagca catccttggc gtctcaactg acgcccctga gacgtcgccc gccgacaata 60
 ggacggcaaa gaaccgctcc 80

<210> 36
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 36
 accgcaaaag aaaagagccc cctcaacgtc gccgtcgcgg aagcccttct gtctctctag 60
 cgcgaaacaga atcgcatctc ctgcaatcct cgtcaagagt ttttagcgcc gttttggtga 120
 gctgatttcc tttgcctgct gaaaggtgaa ag 152

<210> 37
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium rhizogenes

<400> 37
 gtggtcagct gaccac 16

<210> 38
 <211> 1215
 <212> DNA
 <213> Rhizobium etli

<400> 38
 atgaatatgg caccgcaa atgaaaaagca atttccgatg tcgaccagct gatcatcggt 60
 caggcacagg aactatccga caagctgaag cagcatcgcc tcgaaatggt tcttccgcgc 120
 gcgctaaagg gtctgcggga atttcagctt gctgaagtgg cgcggtttct cggcgtgacc 180
 agcggctatc ttcgaaatct ttcgctcgag ggcaagggtg cctcccccca ggttacgccg 240
 tctggccgcc gatcgtatac ggcgagcag atggaggaga tgcgtggctt tctcgagcat 300

```

aatgcgcgcg ccggaacaca ttatgtgcgt catcgccgcg gccacgaaca tctgcaggtc 360
gttgctgtcg tcaacttcaa ggggggcagc ggcaagaaga cgagtgccgc gcatcttgcc 420
cagcatctcg ccctgaccgg tcaccgcgtc ctggccgtcg atctcgatcc gcaagcgtct 480
ctttctgcc a tacacggctt tcagccggag ttgcagctca acgaaaacga gacactctac 540
gccgccattc gctatgacga tcagcggcgt ccgctgcggg acattatccg gccgaccaac 600
ttcccgaacc ttcatctcgt gccgggcaat ctogaactga tggaattcga gcacgatacg 660
ccgcgggtcc tcgctcaggg caaagcgagc gattatgggc gcgtcttctt tgcccggctg 720
gatgaggcgc tggcctcggg cgcggatgat taagcagtcg tcatcatcga ttgcctccc 780
cagcttggt ttttgaccat gagcgccatt tgccgtgcga cggcggttct gatcaccgtt 840
catccgcaga tgctcgatgt catgtcgatg tgccagttcc tgcaaatgct tggcgaagtg 900
ctgaacacgc tgaagggagc cggcggcaat atgaacctcg actggctgcg ttacctcgtg 960
acccgctacg atccgcagga cgggccgcag acgcagatgg tcgccttcac gcgctcgatg 1020
ttcaagagcc atgtgctcac caaccgatg ctgcgcagcg tcgcatctc cgatgcggcg 1080
atgactaacc agacgctgta cgaagtcgag cgaagtcagt ttaccgcgc gacctatgac 1140
cgcgccatgg aggcgatgga gtcagtcaac acggaaatcg tcgatctcat ccataaggca 1200
tggggcccga aatga 1215

```

```

<210>      39
<211>     1050
<212>      DNA
<213>     Rhizobium etli

```

```

<400>      39
atggcgcgta aaaatcttct gtcgggcctg atggacgatt ccaagaagtt tactgcggta 60
aacaatgagg atgagccggc cctcgcgac gagaggcagc atatcaccta taaggggatt 120
ggcgcgctcg gtgcggtcac ccgcagcatc gatgccttgg ccgccaaggc cgatgcgcgc 180
aaggcgatcg aagagcagct ggcgagcggc gagacggtga tcgatctcga cccggcgctg 240
atogaagatt ccttcgtgac cgaccggctg gcgcatactg acgaacagtt ccgggaatta 300
gtcgaggcga tccgcctgcg cggccaggat tcaccgatcc ttgtgcgccc gcatcccag 360
agggaggggc gatatcagat cgcttttggt catcgtcgtg cgcgggcggc aaaggagctc 420
ggccgacctg tccgggcggg ggtcaagaga ctgcagacc gcgacctgt cattgcgcag 480
ggccaggaga attcggcacg cgcgatctc tccttcacg agaggacgat gtttgccgac 540
aagctcgaca cgttgggttt cgaccgggaa acgatcatgt cggcactcag cgcagacaag 600

```

acgacgggtgt ccaagatgct gtcggtcacg aagcggattc cggccgaagt cctggccgcg 660
 atcggcgtag ccaagacgac tggccgcgat cgctggcatg atctttcggc gaaattcgag 720
 acggaaaaca tcgcagcccg ggcgattgag ttcaccagat cggaggagtt cgagacggcc 780
 gagccggacg cccgcttcga catgcttgtc gccttcacga gcaggaacca acaggcgctc 840
 cccgcccgcg cagttcagcc cgtggcgcac gcctggcagc gccgggacgg agccgtcaaa 900
 gcgaagatca aggatgatgg aaaacagttc accatcgcg cgaaggcgga gaaggcatct 960
 gcctttggcg cctacatcgc cagcaatctg gatcgtctct acgaggcggt cgagaagaca 1020
 caggatttga cgaagaacgg agatcaataa 1050

<210> 40
 <211> 1293
 <212> DNA
 <213> Rhizobium etli

<400> 40
 atggaaagcg gaagtgtgac gacgcccttc gggcgggcggc cgatgacgtt tggcatgttg 60
 gcaagtcagg ccgctgcccc aaaaatcgag cccggccgat cgattgataa atggaaactc 120
 tatcgcgccc tgtgcgagggc caggccgctg ctccggcatta cagaccgggc gctttccatc 180
 ctgaacgcct tgctgagctt ttatcccaag ggagagctct ccgaggagaa cggcttggtc 240
 gtatttcctt cgaatacgcg gctctctctg cgcgcgcgat gaatggcgga gcagacgac 300
 cgtcgccacc tggcgggcgt gatcgaggcc ggattgctga tcgcgaagga cagcccgaa 360
 ggcaagcggt acgctcgcaa ggagcagggc ggggagatcc gtgaggcatt cggcttctcg 420
 ctggcgccgc tgcttgcgcg cgcggacgag atcgagcggc tggcgggcca gatggcagcc 480
 gaacgattgc agctgcagcg gctcaaagag cgcctgacgc tttgcaggcg cgacatcgcc 540
 aagctcatcg agatggcgt ggaagagggc gcctctggtg attggagcgg ggtccacctg 600
 cattttcgag gcatcgtcga acggctgccg cgctcgccat ccttcgagaa gattgccgcc 660
 gcactcgacg aactggaact gttgcgcgaa gaaatcacca atcagttgga aatgcagggt 720
 aaagctccaa atcaaagcg caatgcccga cattctgagc ggcacataca gaattcaaac 780
 ccacactaca ctactgaact tgaaccacgc ttcgaaacga agcagggcgc aacggtggac 840
 gaccaatcgg aagggtgggc cgagccgagg gccagaatag cgacacagga ggggaagggc 900
 aggcccatgc cagctgcaaa ctacgctcg gttgccggcg gcgggctcaa atccttccc 960
 ctgggccttg tgctgcaggc ctgcccagag atcgccgcct atggaccgca gggctcgggt 1020
 ggcacatggc gcgatctgat ggcggcggtc gtcgtcgtgc gctcaatgct cggagtgagc 1080
 ccctcgccct atgaacaggc ctgcgaggtc atggggcctg aaaatgcggc taccgtcata 1140

gcgtgcgtgc ttgaaagggc agggcacatc aattccgccg gtggttacct ccgtgacctg 1200
 acccgccgcg ccgagagagg cgaatttgcc atcggaccga tgttgatggc gttgtccgc 1260
 accaattcgc caatcagagg caagaccgga tga 1293

<210> 41
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Rhizobium etli

<400> 41
 gcgggaagtt tactgcggt aaccggggca aggagctggt tg 42

<210> 42
 <211> 149
 <212> DNA
 <213> Rhizobium etli

<400> 42
 gcaaaagaaa agggccccga acgttgccgt cgcggaagcc ctctctgac tagacacca 60
 gagaatcaca tttccgcgaa tcatagtcaa gagtctttgg caccgaattt ggtgaggcgt 120
 gatcttttgc cttgaagaag gcgaagaaa 149

<210> 43
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens
 <400> 43

aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60
 cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaatg ctgctccgtc 120
 gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgacagg aatgccaaagc 180
 actcccaggg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240
 ttcacgcctt tttaaatc cgattattct aataaacgct cttttctctt aggtttacc 300
 gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt t 331

<210> 44
 <211> 442
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens
 <400> 44

ctcatctaag ccccatcttg gacgtgaatg tagacacgtc gaaataaaga tttccgaatt 60
 agaataattt gtttattgct ttcgcctata aatacgacgg atcgtaattt gtcgttttat 120
 caaaatgtac tttcatttta taataacgct gcggacatct acatttttga attgaaaaaa 180
 aattggtaat tactctttct ttttctccat attgaccatc atactcattg ctgatccatg 240
 tagatttccc ggacatgaag ccatttacaa ttgaatatat cctgccgccg ctgccgcttt 300
 gcacccgggtg gagcttgcat gttggtttct acgcagaact gagccggtta ggcagataat 360
 ttccattgag aactgagcca tgtgcacctt ccccccaaca cggtgagcga cggggcaacg 420
 gagtgatcca catgggactt tt 442

REIVINDICAÇÕES

1. Constructo de DNA para transformar plantas compreendendo:

- i) pelo menos uma região de limite de T-DNA;
- ii) pelo menos um transgene heterólogo adjacente à região de limite;
- iii) uma região de codificação para um marcador selecionável bacteriano; e
- iv) pelo menos um segmento de DNA, compreendendo um elemento cis e/ou trans de uma origem de replicação para manter um baixo número de cópias do constructo de DNA em uma bactéria competente para a transformação de pelo menos uma primeira célula de planta.

2. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma região de limite de T-DNA é uma região de limite à direita ou uma região de limite à esquerda.

3. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que o transgene heterólogo quando expresso em uma célula de planta transformada proporciona um fenótipo agrônômico para a célula ou uma planta transformada derivada da célula.

4. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que a região de codificação para o marcador selecionável bacteriano compreende um gene de resistência a antibióticos selecionado a partir do grupo consistindo em um gene de resistência à canamicina, gene de resistência à gentamicina, gene de resistência ao cloranfenicol, gene de resistência à espectinomicina, gene de resistência à estreptomina, gene de resistência à tetraciclina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à blasticidina, gene de resistência à higromicina, gene de resistência à puromicina, e gene de resistência à Zeocina.

5. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que a origem de replicação compreende uma origem de *repABC*.

6. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 5, em que

a origem de *repABC* é selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4.

7. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que o pelo menos um segmento de DNA compreende os genes de origem de replicação *repA*, *repB*, e *repC*.

8. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que o pelo menos um segmento de DNA compreende a sequência intergênica 1 (*igs1*) e a sequência intergênica 2 (*igs2*).

9. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que o pelo menos um segmento de DNA compreende uma sequência palindrômica de 16 pares de bases.

10. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que a bactéria é selecionada a partir do grupo que consiste em *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp. *Ochrobactrum* spp. e *Bradyrhizobium* spp.

11. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente compreendendo pelo menos uma primeira origem de replicação para manter as cópias do constructo em *E. coli*.

12. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 11, em que a origem de replicação é derivada de pBR322 e/ou pUC.

13. Célula transformada com o constructo de DNA como definido na reivindicação 1.

14. Célula de acordo com a reivindicação 13, definida como uma célula de planta.

15. Célula de acordo com a reivindicação 13, definida com uma célula bacteriana.

16. Célula bacteriana de acordo com a reivindicação 15, em que a célula é competente para a transformação de pelo menos uma primeira célula de planta.

17. Célula bacteriana de acordo com a reivindicação 16, em que a bactéria é selecionada a partir do grupo que consiste em *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacte-*

rium spp., *Ochrobactrum* spp. e *Bradyrhizobium* spp.

18. Método para transformar uma célula de planta compreendendo contatar pelo menos uma primeira célula de planta com a célula bacteriana como definido na reivindicação 16, em que a célula bacteriana é competente para a transformação da dita primeira célula de planta; e selecionar a dita primeira célula com base na presença de pelo menos um transgene heterólogo introduzido na célula de planta pela célula bacteriana.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que a célula de planta é uma célula de planta de soja, canola, milho, ou algodão.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, adicionalmente compreendendo regenerar uma planta a partir da célula de planta.

21. Método de produzir alimento, ração ou um produto industrial compreendendo: obter a planta de acordo com a reivindicação 20 ou uma parte dela; e preparar o alimento, a ração ou o produto industrial a partir da planta ou de sua parte.

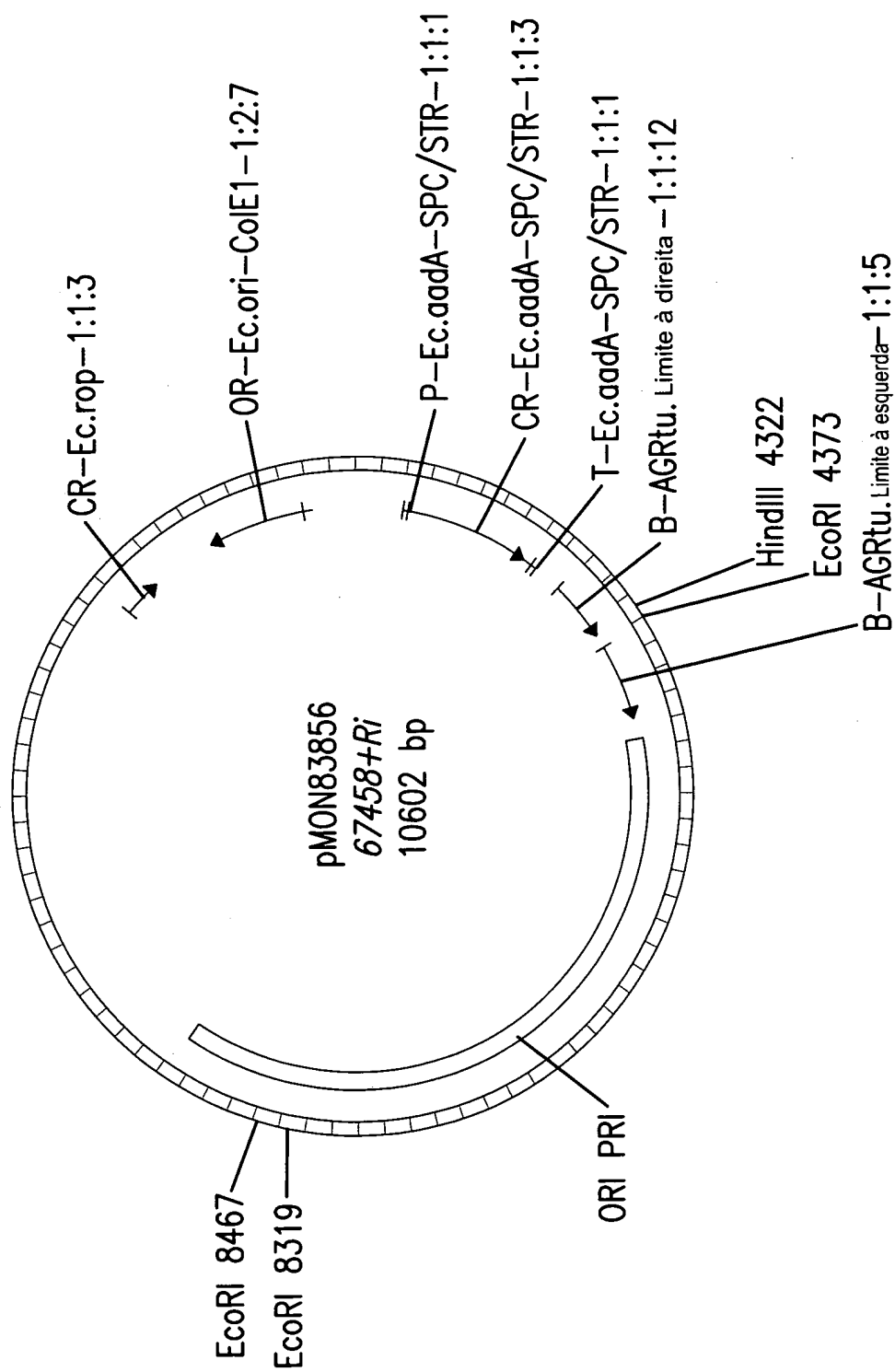


FIG.1

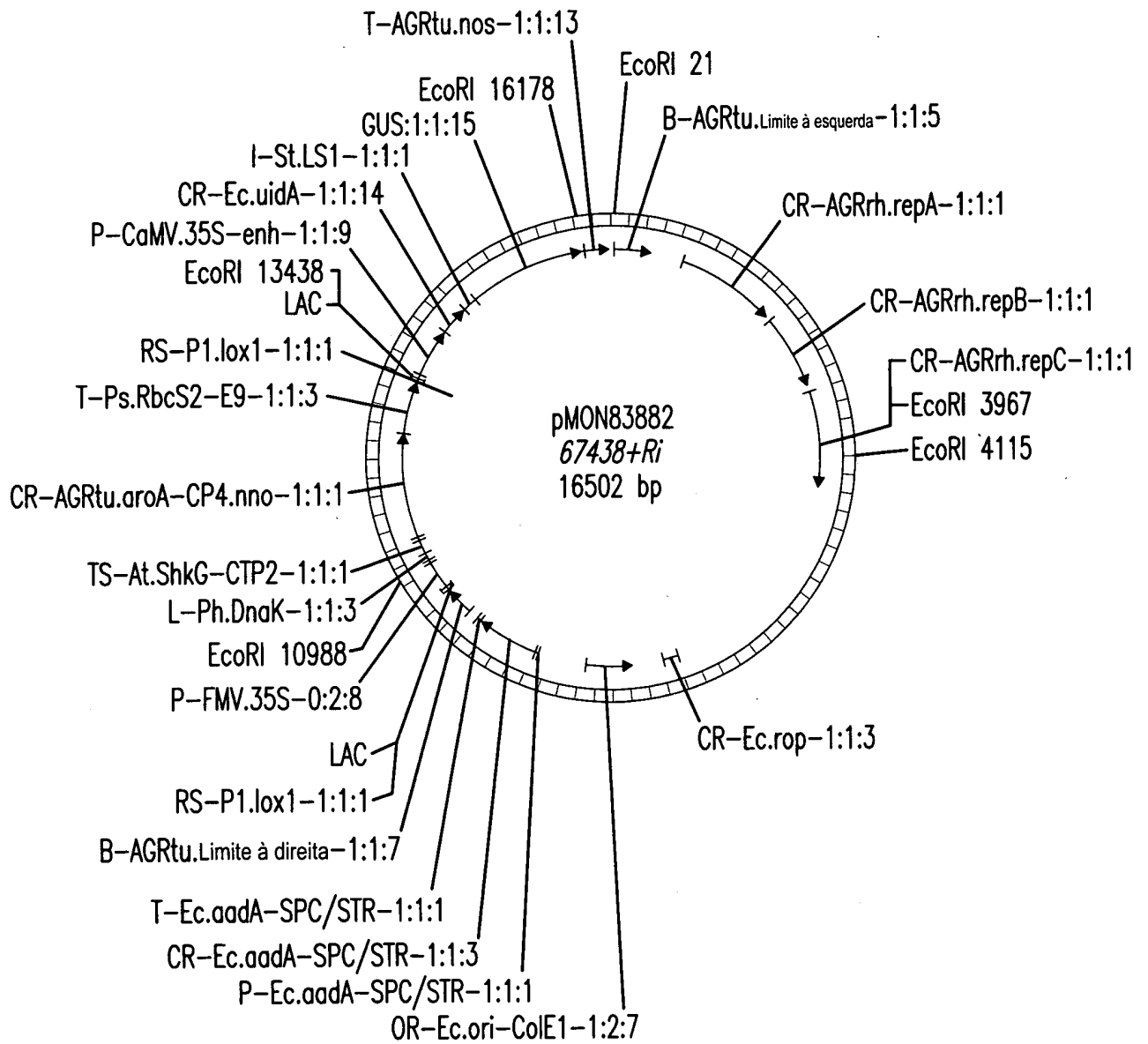


FIG.2

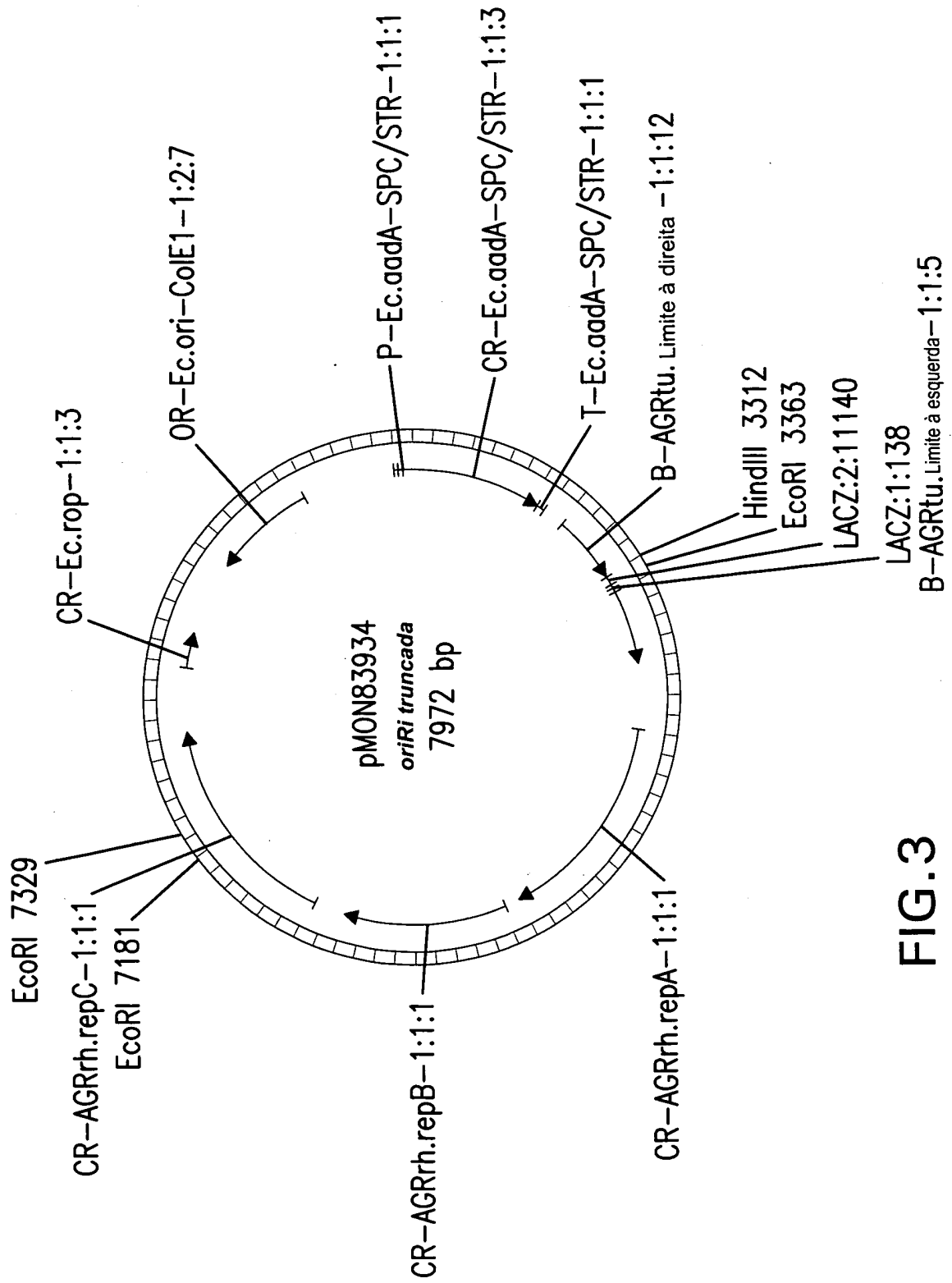


FIG.3

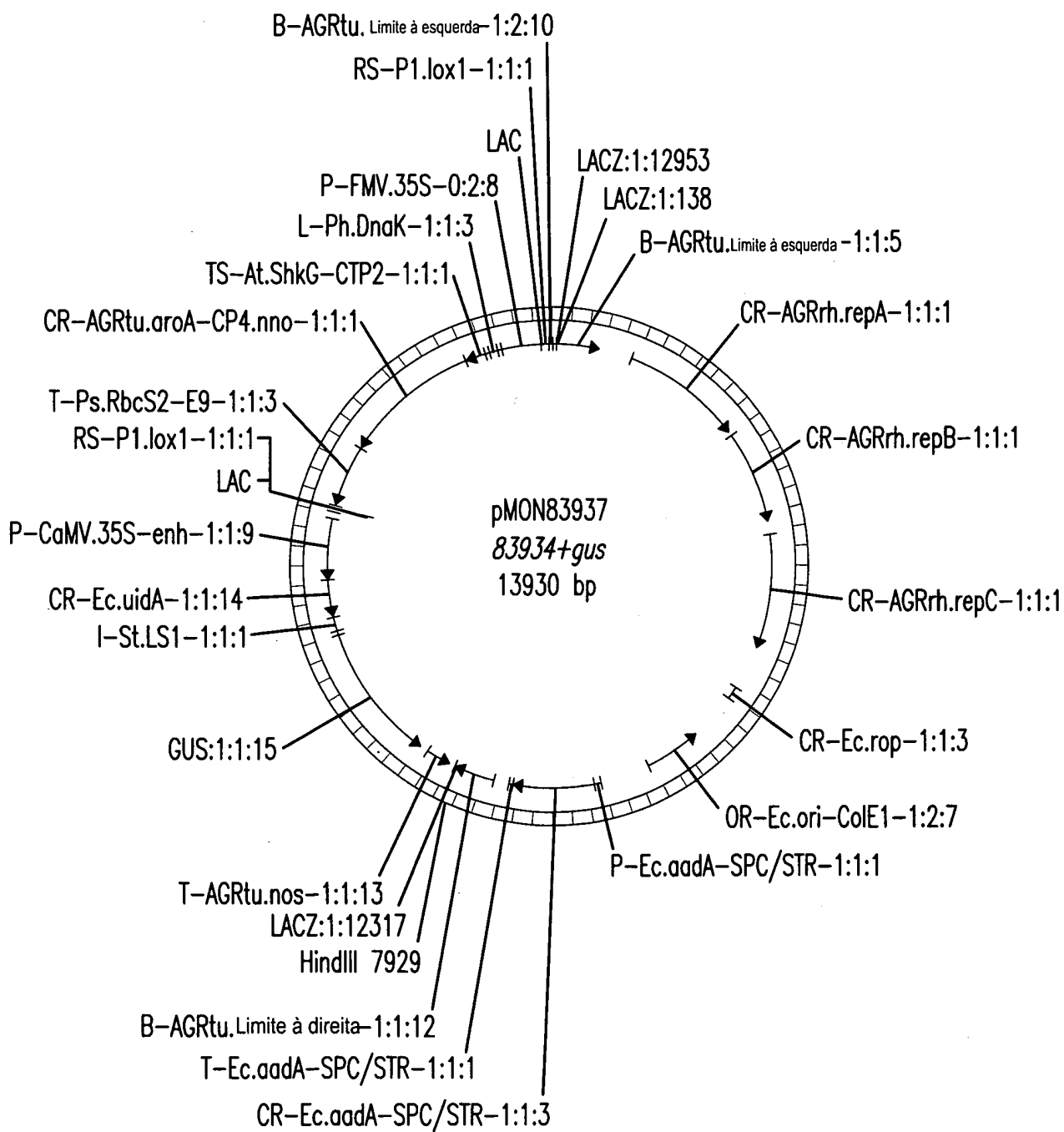


FIG.4

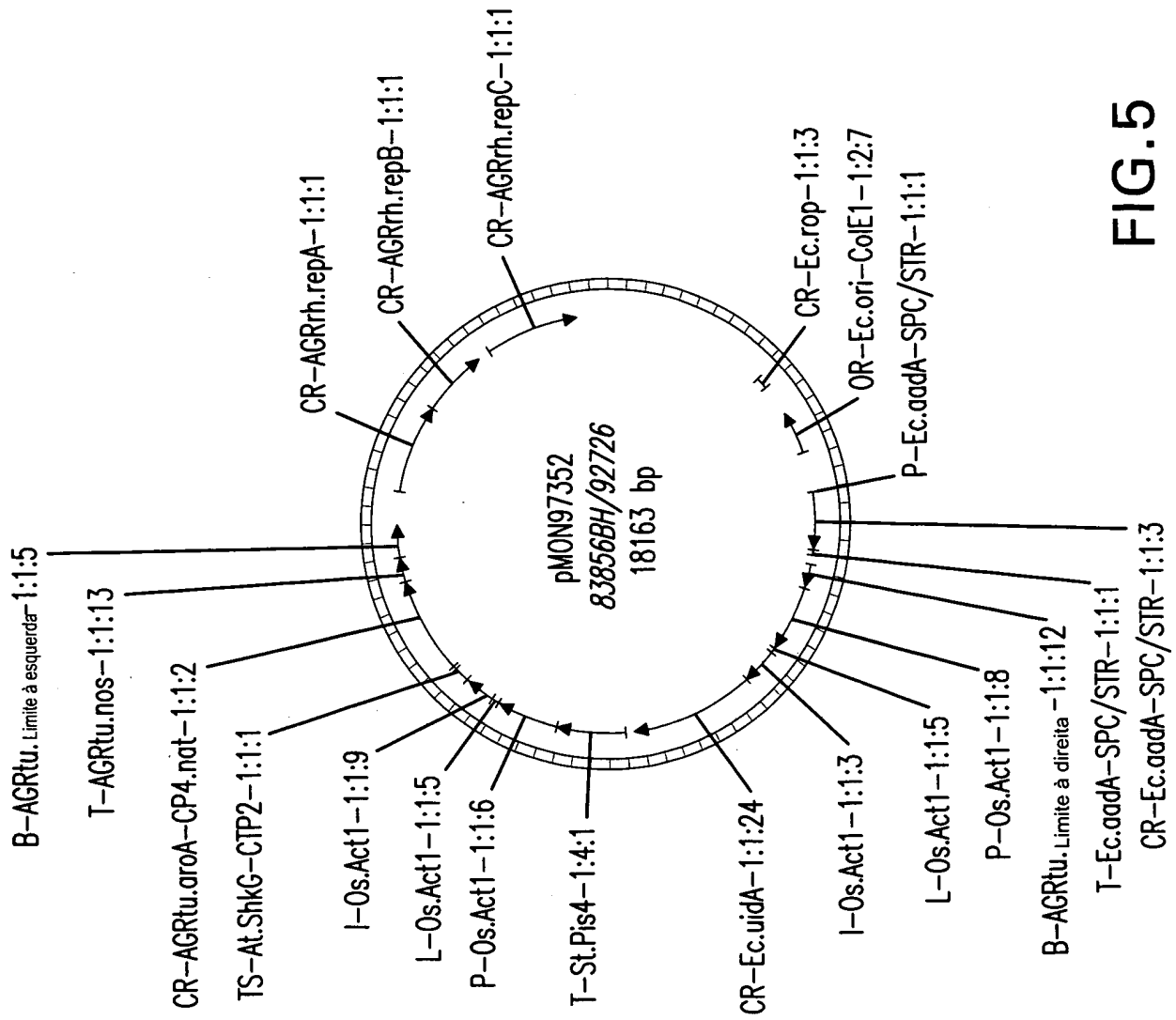


FIG.5

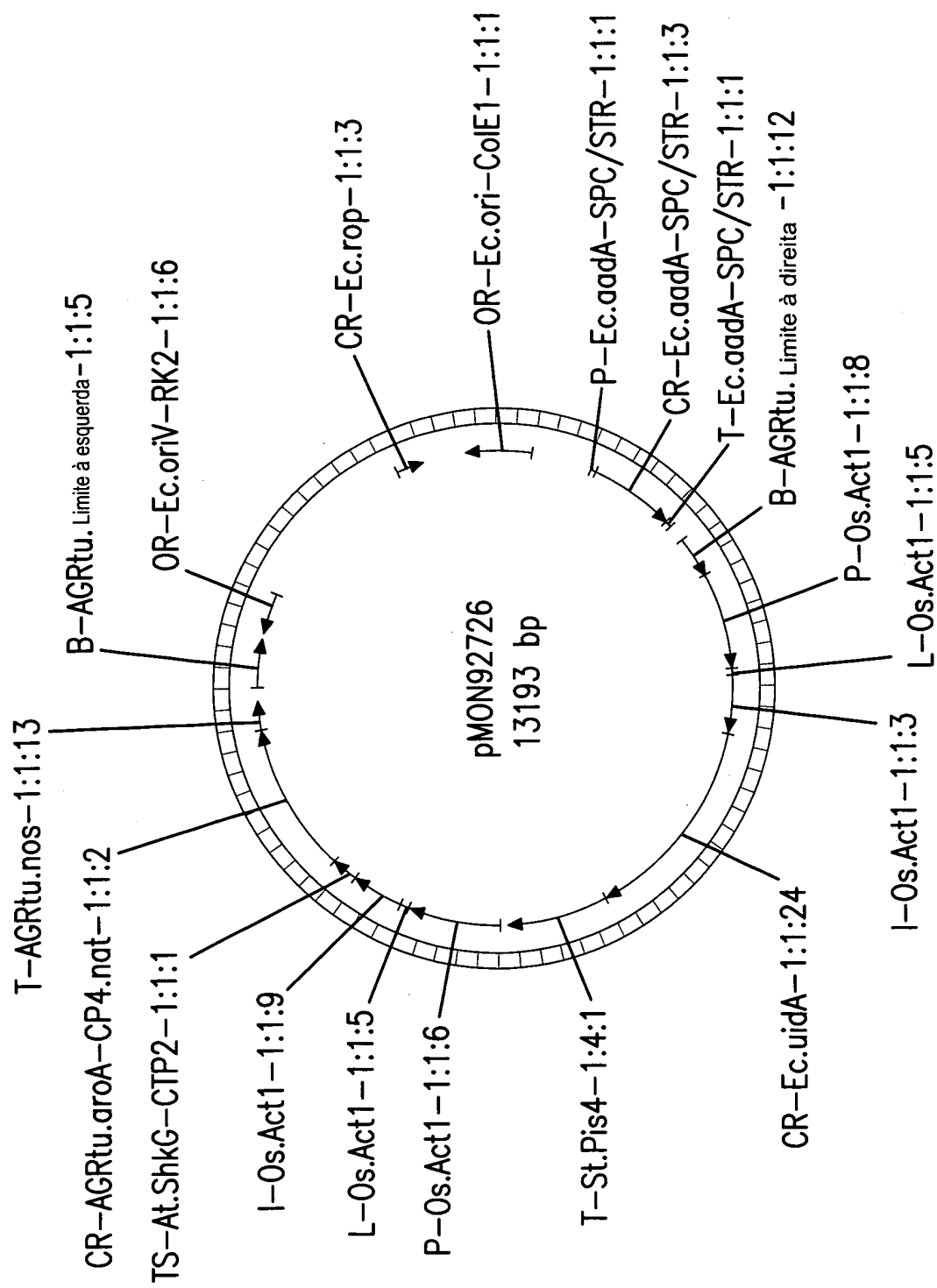


FIG. 6

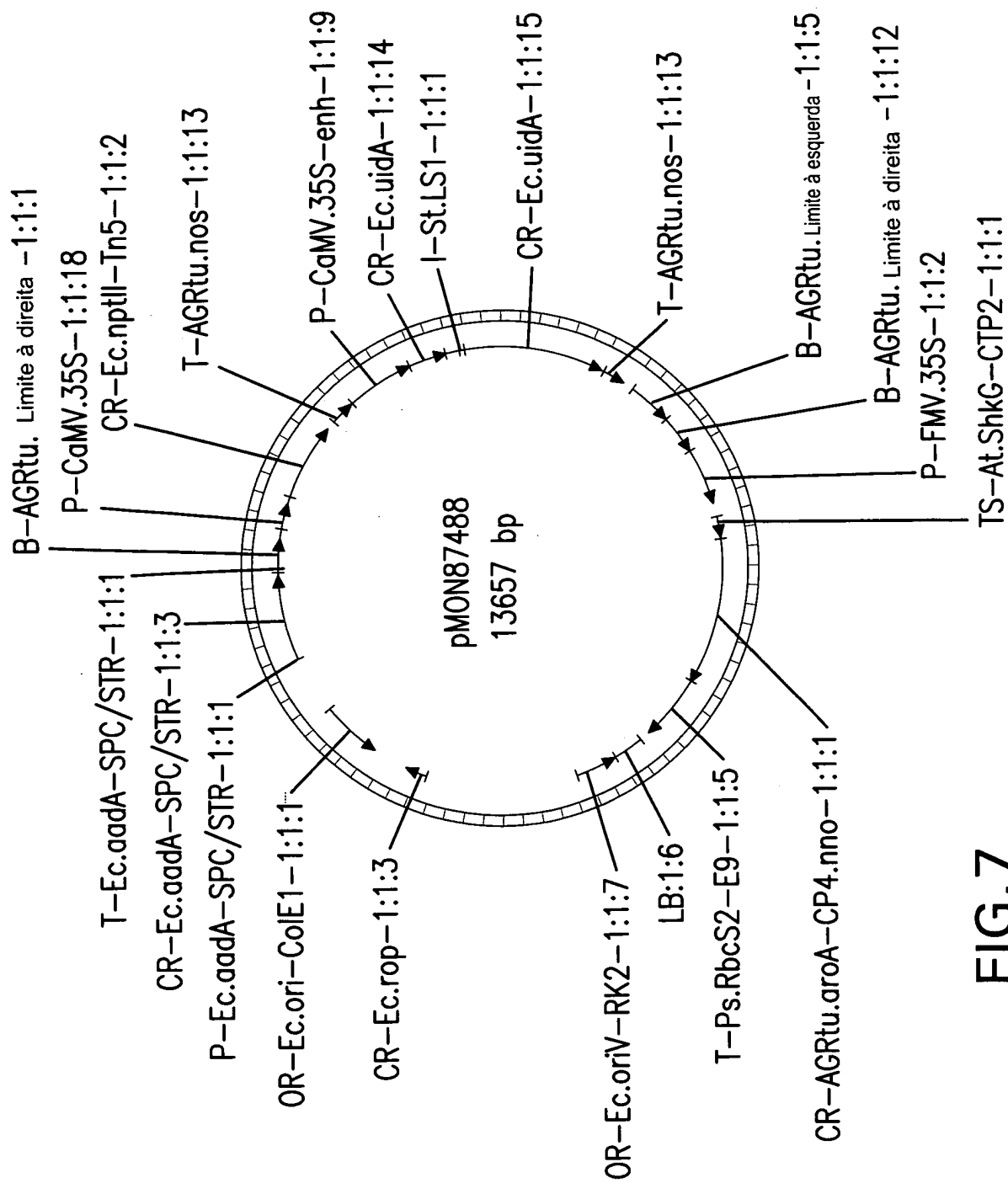


FIG. 7

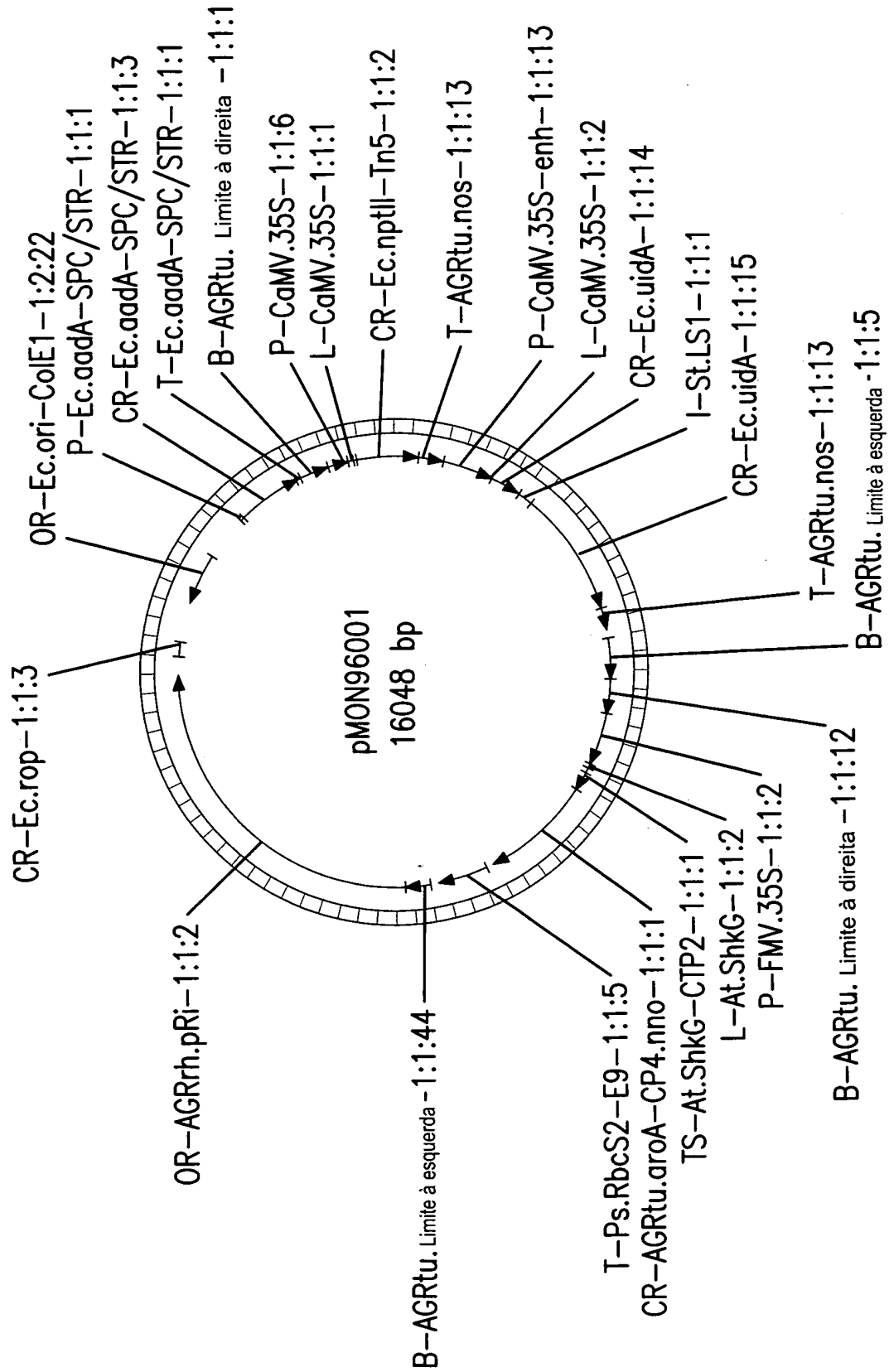


FIG.8

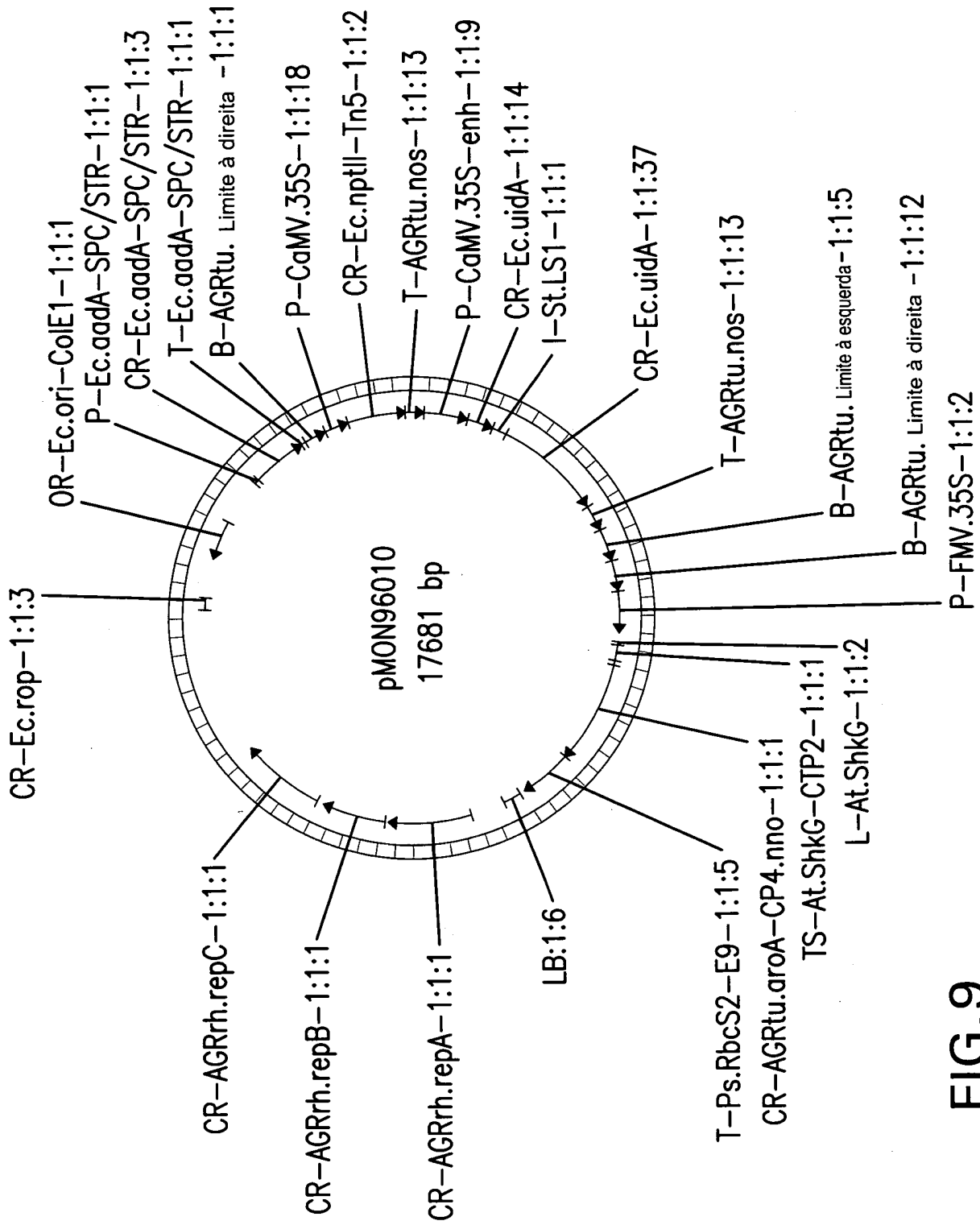


FIG. 9

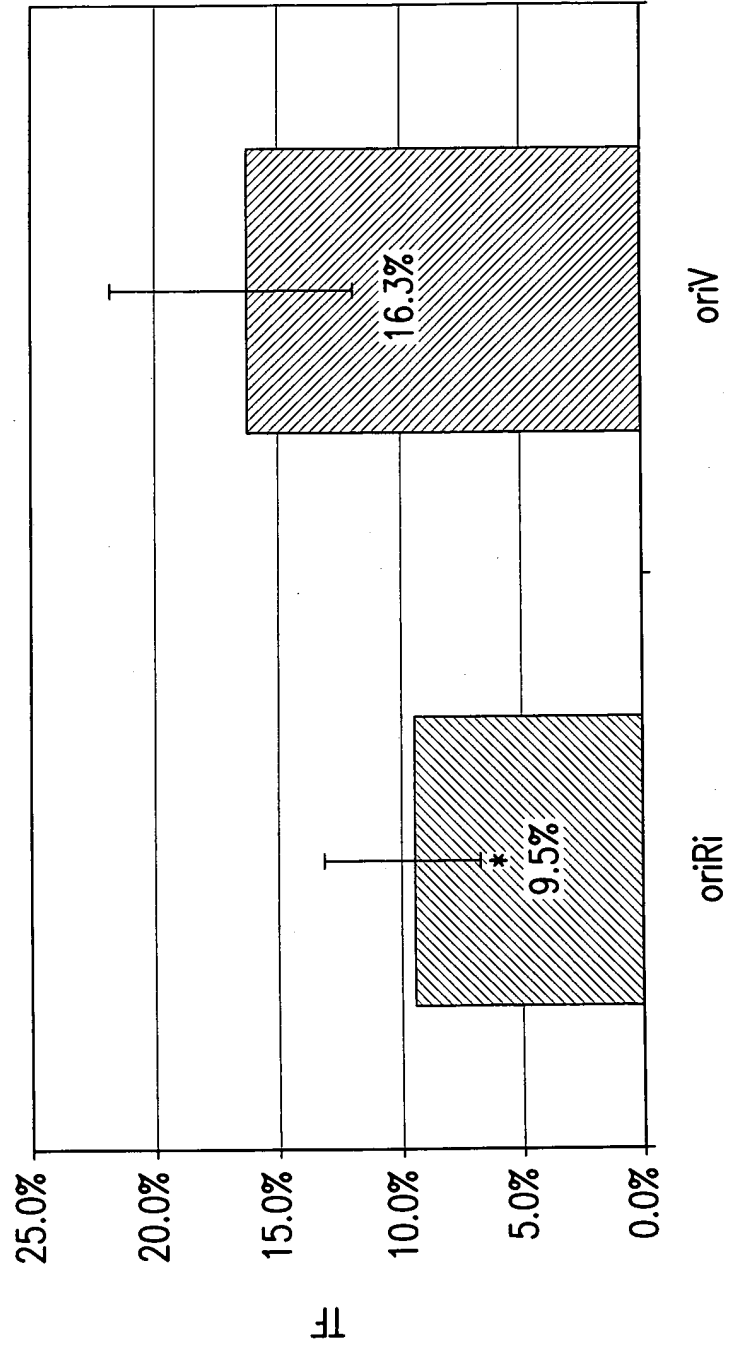


FIG.10

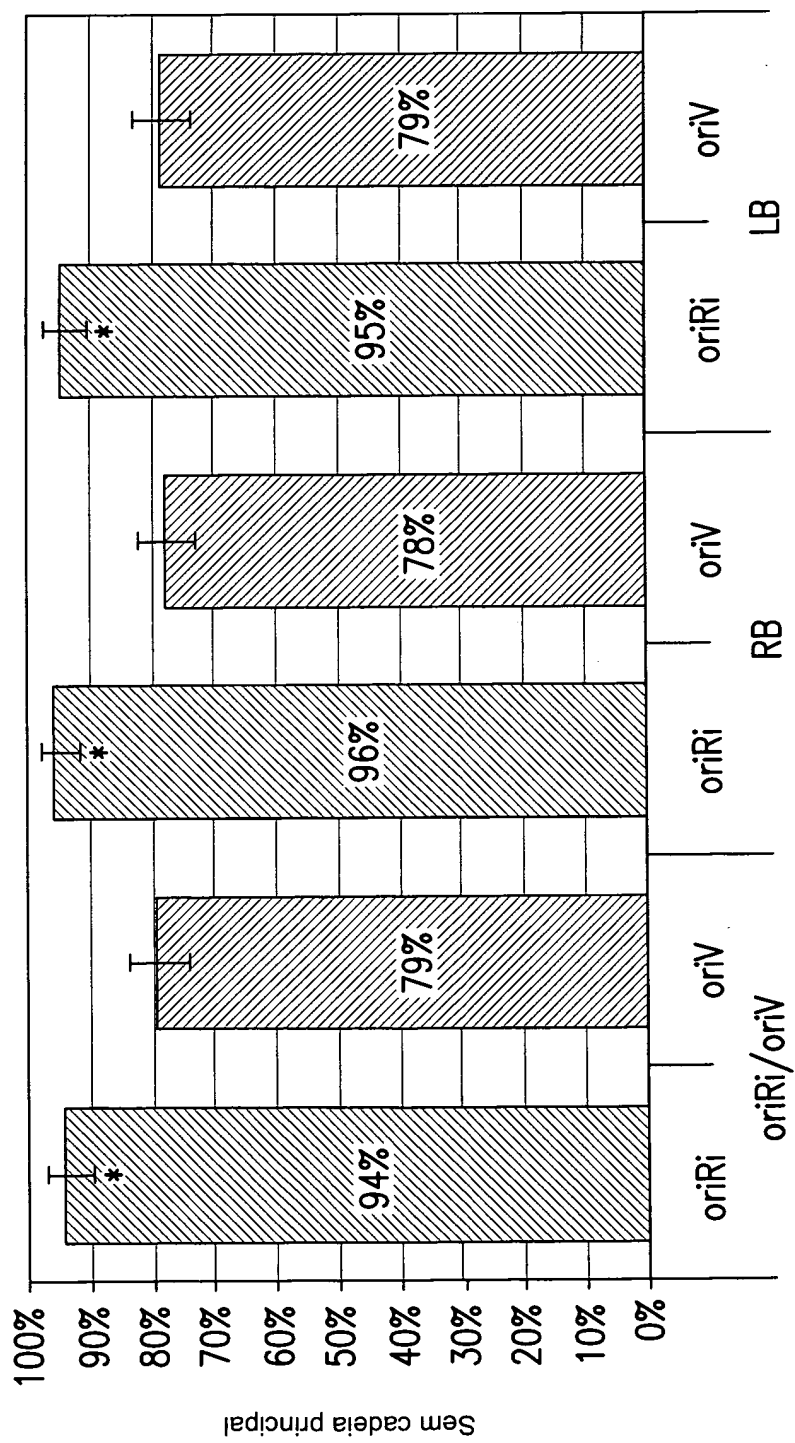


FIG.11

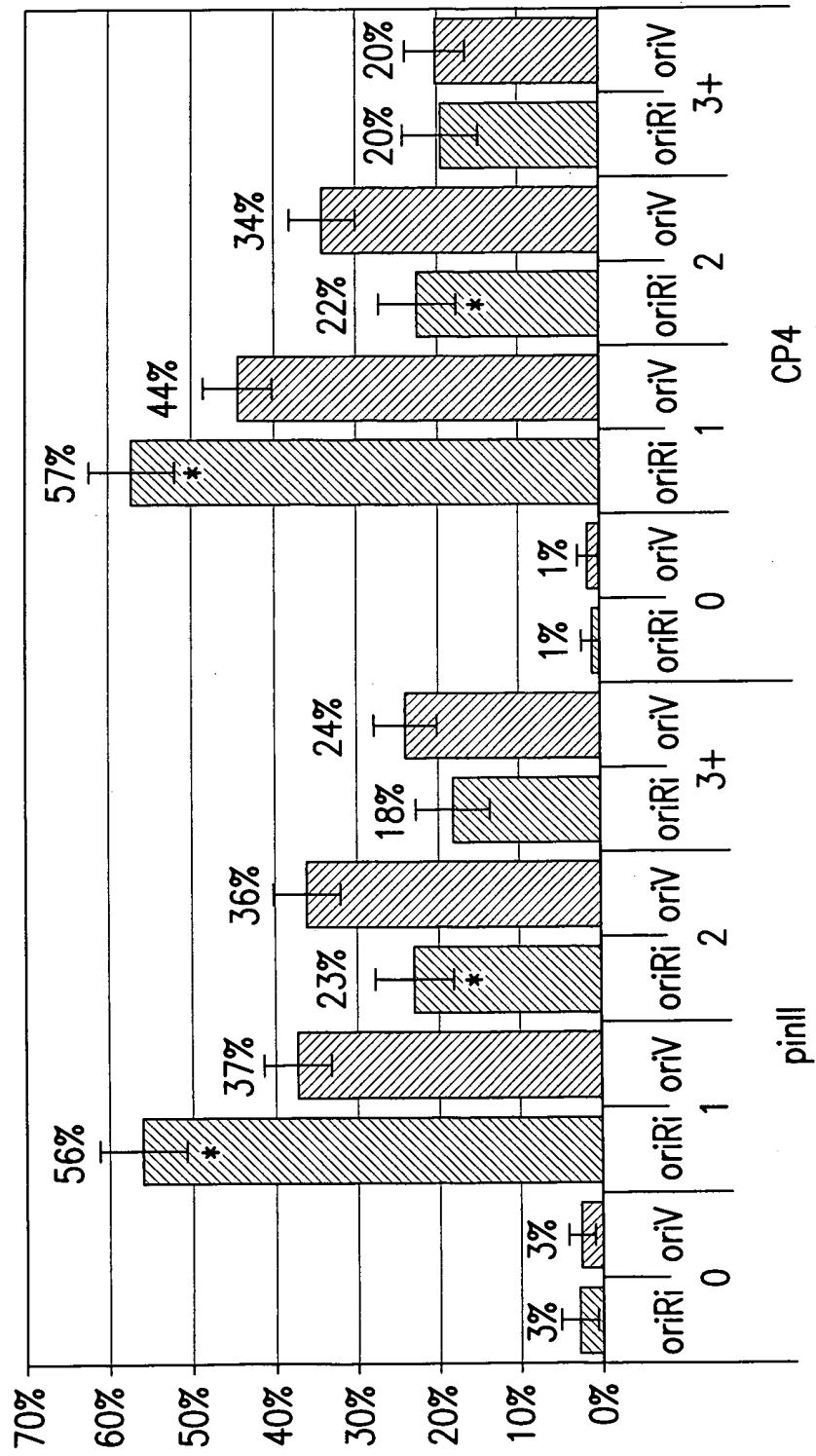


FIG.12

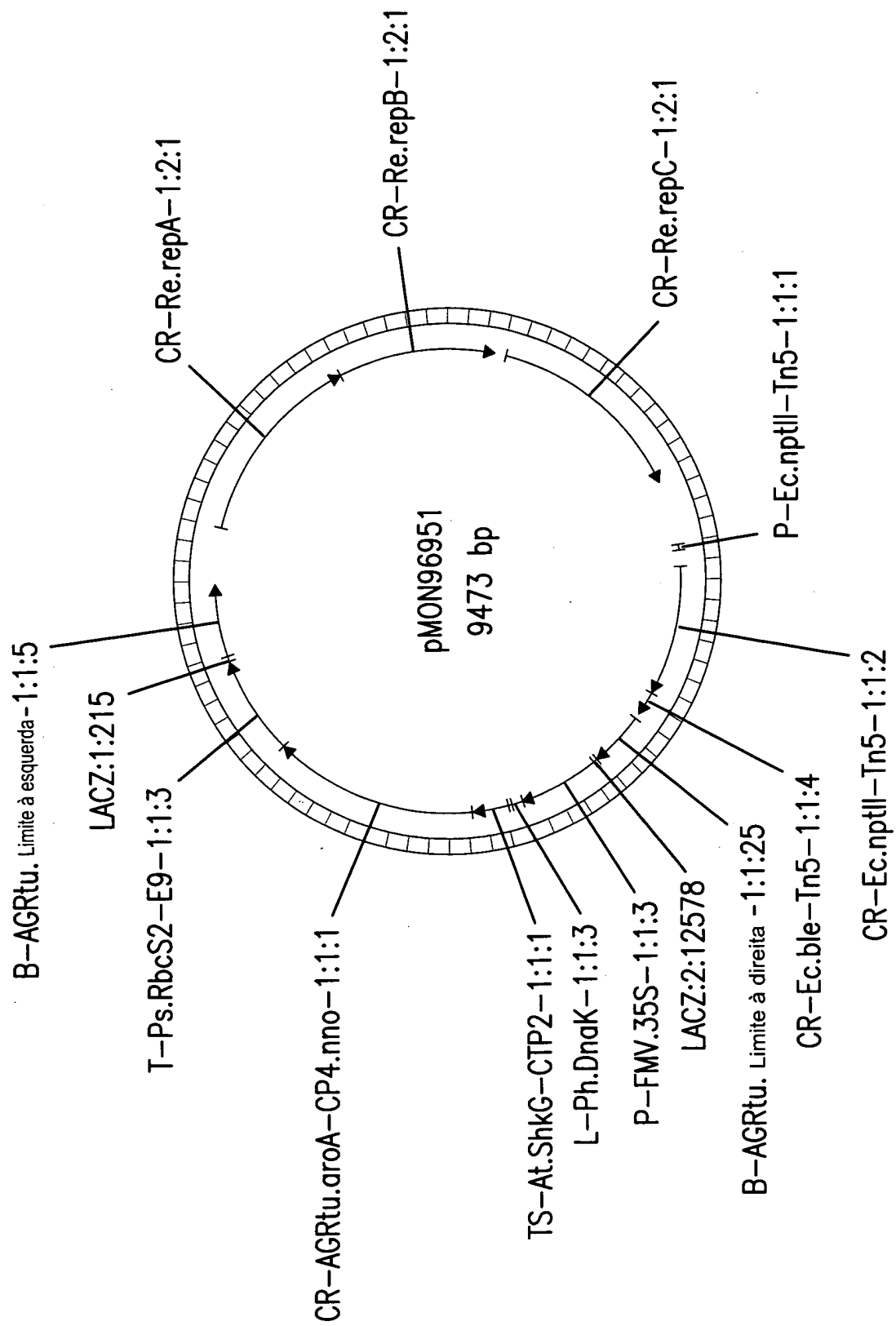


FIG.13

PI 0615680-0

RESUMO

Patente de Invenção: **"VETORES E MÉTODOS PARA A EFICIÊNCIA APERFEIÇOADA DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS"**.

5 Proporcionam-se métodos e composições para a transformação aperfeçoada de plantas mediada por bactéria. Os métodos geralmente permitem a transformação das plantas com integração reduzida da cadeia principal do vetor e uma frequência alta de ocorrências de transformação com poucas cópias. Vetores são descritos para obter estes resultados, como são os métodos para o seu uso.