



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0407592-7 B1



(22) Data do Depósito: 17/02/2004

(45) Data de Concessão: 31/12/2019

(54) Título: 5-ENOLPIRUVILSHIKIMATO-3-FOSFATO SINTASE (EPSPS) DE CLASSE I RESISTENTE AO GLIFOSATO, MOLÉCULA DE DNA CODIFICANDO A MESMA, CONSTRUCTO DE DNA E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO DE UMA PLANTA TOLERANTE AO GLIFOSATO E DE CONTROLE DE ERVAS-DANINHAS

(51) Int.Cl.: C12N 9/10; A01K 67/027; C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 18/02/2003 US 60/448,438.

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

(72) Inventor(es): MURTAZA F. ALIBHAI; CLAIRE CAJACOB; PAUL C. C. FENG; GREGORY R. HECK; YOU LIN QI; STANISLAW FLASINSKI; WILLIAM C. STALLINGS.

(86) Pedido PCT: PCT US2004004636 de 17/02/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/074443 de 02/09/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/08/2005

(57) Resumo: "5-ENOLPIRUVILSHIKIMATO-3-FOSFATO SINTASE (EPSPS) DE CLASSE 124> RESISTENTE AO GLIFOSATO". As composições e os processos divulgados aqui fornecem novas moléculas de DNA que codificam proteínas EPSPS resistentes ao glifosato e plantas que contêm estas novas proteínas. As plantas que expressam as novas proteínas EPSPS são por si só tolerantes aos efeitos herbicidas do glifosato.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "5-ENOLPIRUVILSHIKIMATO-3-FOSFATO SINTASE (EPSPS) DE CLASSE I RESISTENTE AO GLIFOSATO, MOLÉCULA DE DNA CODIFICANDO A MESMA, CONSTRUCTO DE DNA E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO DE UMA PLANTA TOLERANTE AO GLIFOSATO E DE CONTROLE DE ERVAS-DANINHAS".

[0001] Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 60/448.438, depositado em 18 de fevereiro de 2003, cujo conteúdo total é incorporado aqui como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se à biologia molecular de plantas e à engenharia genética de plantas para resistência a herbicidas e, mais particularmente, às 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintases de classe I modificadas em relação à resistência ao glifosato. Os métodos de engenharia genética de plantas são utilizados para modificar o DNA da 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase de classe I e as proteínas modificadas e para transferir estas moléculas para plantas de importância agrícola. Mais especificamente, a invenção compreende composições de DNA e de proteínas das 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintases resistentes ao glifosato e as plantas que contêm estas composições.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] A N-fosfonometilglicina, também conhecida como glifosato, é um herbicida bem conhecido que possui atividade em um espectro amplo de espécies de plantas. O glifosato é o ingrediente ativo do Roundup® (Monsanto Co., St. Louis, MO), um herbicida que possui um longo histórico de uso seguro e uma meia-vida curta desejável no ambiente. Quando aplicado na superfície de uma planta, o glifosato se move sistematicamente ao longo da planta. O glifosato é fitotóxico por causa de sua inibição da via do ácido shikímico, que fornece um

precursor para a síntese de aminoácidos aromáticos. O glifosato inibe a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase de classe I (EPSPS) encontrada em plantas e em algumas bactérias. A tolerância ao glifosato em plantas pode ser atingida através da expressão de uma EPSPS de classe I modificada que possui menor afinidade pelo glifosato e ainda mantém sua atividade catalítica na presença do glifosato (Patentes U.S. Nos 4.535.060 e 6.040.497). "Tolerante" ou "tolerância" se refere a um efeito reduzido de um agente sobre o crescimento e o desenvolvimento e o rendimento de uma planta, em particular, tolerância aos efeitos fitotóxicos de um herbicida, especialmente o glifosato.

[0004] As enzimas, tais como, as EPSPSs de classe II foram isoladas de bactérias que são naturalmente resistentes ao glifosato e quando a enzima é expressa na forma de um transgene em plantas fornece tolerância ao glifosato para as plantas (Patentes U.S. Nos 5.633.435 e 5.094.945). As enzimas que degradam o glifosato nos tecidos vegetais (Patente U.S. No 5.463.175) também são capazes de conferir tolerâncias das plantas ao glifosato. As constructos de DNA que contêm os elementos genéticos necessários para a expressão das enzimas resistentes ou das enzimas que degradam o glifosato criam transgenes quiméricos úteis nas plantas. Tais transgenes são utilizados para a produção de plantas de cultivo transgênicas que são tolerantes ao glifosato, permitindo assim que o glifosato seja utilizado para o controle eficiente de ervas daninhas com uma preocupação mínima de danos nas plantas de cultivo. Por exemplo, a tolerância ao glifosato foi engenheirada geneticamente no milho (Patente U.S. No 5.554.798), no trigo (Zhou e outros, Plant Cell Rep. 15: 159-163, 1995), na soja (WO 9200377) e na canola (WO 9204449). Os transgenes para a tolerância ao glifosato e os transgenes para a tolerância a outros herbicidas, por exemplo, o gene bar (Sh.Bar) podem ser incluídos nas constructos de DNA para uso como um marcador de seleção para a transformação

vegetal (a presente invenção pMON81519; e Toki e outros, Plant Physiol., 100: 1503-1507, 1992; Thompson e outros EMBO J. 6: 2519-2523, 1987, fosfinotricina acetiltransferase DeBlock e outros EMBO J., 6:2513-2522, 1987, herbicida glufosinato) são também úteis como marcadores de seleção ou marcadores de mensuração e podem fornecer um fenótipo útil para a seleção de plantas transgênicas quando o gene marcador estiver ligado a outras características agrícolas úteis.

[0005] O desenvolvimento de plantas de cultivo tolerantes a herbicidas tem sido uma brecha principal na biotecnologia agrícola uma vez que forneceu aos agricultores novos métodos de controle de ervas daninhas. Uma enzima que foi engenheirada de forma bem sucedida para resistência ao seu herbicida inibidor é a EPSPS de classe I. As variações da EPSPS de classe I foram isoladas (Pro-Ser, Patente U.S. No 4.769.061; Gly-Ala, Patente U.S. No 4.971.908; Gly-Ala, Gly-Asp, Patente U.S. No 5.310.667; Gly-Ala, Ala-Thr, Patente U.S. No 5.886.775) que são resistentes ao glifosato. Entretanto, muitas variações da EPSPS não demonstram um K_i suficientemente alto para o glifosato ou possuem um K_m para o piruvato de fosfoenol (PEP) muito alto para ser eficiente como uma enzima de resistência ao glifosato para uso em plantas (Padgett e outros, Em "Herbicide-resistant Crops", Capítulo 4 pp 53-83, ed. Stephen Duke, Lewis Pub, CRC Press Boca Raton, FL 1996). Entretanto, uma variação da EPSPS de classe I, T102I/P106S (TIPS) que fica ligada de forma operacional a um promotor heterólogo mostrou fornecer tolerância ao glifosato para as plantas transgênicas de milho (Patente U.S. No 6.040.497). Uma EPSPS tolerante ao glifosato também foi isolada da erva daninha Eleusine indica [WO 01/66704].

[0006] Há uma necessidade no campo da biologia molecular de plantas de uma diversidade de genes que podem fornecer um fenótipo de marcador de seleção positiva. Em particular, a tolerância ao glifosato

é utilizada extensivamente como um marcador de seleção positiva em plantas e é um fenótipo valioso para uso na produção de plantas de cultivo. O agrupamento e a combinação de características transgênicas existentes com características recém-desenvolvidas são maiores quando genes distintos de seleção positiva são utilizados. Os genes marcadores fornecem um fenótipo distinto, tal como, tolerância a antibióticos ou a herbicidas ou uma distinção molecular que pode ser discernida através de métodos utilizados para a detecção do DNA. As plantas transgênicas podem ser selecionadas em relação às características agrupadas através da análise em relação à tolerância a vários antibióticos ou herbicidas ou em relação à presença de novas moléculas de DNA através de métodos de detecção de DNA. A presente invenção fornece composições de DNA e de proteínas das EPSPS sintases de classe I variantes resistentes ao glifosato. A presente invenção fornece ainda constructos de DNA úteis nas plantas e nas plantas transgênicas que exibem tolerância ao glifosato.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] Em um aspecto da invenção é fornecida uma molécula de DNA de EPSPS modificada isolada que codifica uma proteína EPSPS tolerante ao glifosato que possui isoleucina ou leucina na posição 102 e um aminoácido na posição 106 selecionado do grupo que consiste em treonina, glicina, cisteína, alanina e isoleucina. Em um outro aspecto da invenção está um constructo de DNA que compreende um promotor que funciona nas células vegetais ligada de forma operacional com uma molécula de DNA da EPSPS que codifica uma proteína EPSPS tolerante ao glifosato que possui isoleucina ou leucina na posição 102 e um aminoácido na posição 106 selecionado do grupo que consiste em treonina, glicina, cisteína, alanina e isoleucina. Ainda em um outro aspecto da invenção é fornecida uma planta transgênica que contém o constructo de DNA, em que a planta transgênica é tolerante ao herbicida

glifosato.

[0008] Em um outro aspecto da invenção há um método de preparação de uma planta transgênica fértil que compreende o fornecimento de um cassete de expressão vegetal que possui um gene de EPSPS modificado que codifica uma proteína EPSPS que possui isoleucina ou leucina na posição 102 e um aminoácido na posição 106 selecionado do grupo que consiste em treonina, glicina, cisteína, alanina e isoleucina; e o contato de células vegetais receptoras com o cassete de expressão vegetal sob condições que permitem a captação do cassete de expressão vegetal pelas células receptoras; e a seleção das células vegetais receptoras que contêm o cassete de expressão vegetal; e a regeneração de plantas partindo das células vegetais receptoras; e a identificação de uma planta transgênica fértil que é tolerante ao glifosato.

[0009] Em um outro aspecto da invenção há uma planta transgênica tolerante ao glifosato fértil que contém um cassete de expressão vegetal que possui um gene EPSPS vegetal modificado que codifica uma proteína EPSPS que possui isoleucina ou leucina na posição 102 e um aminoácido na posição 106 selecionado do grupo que consiste em treonina, glicina, cisteína, alanina e isoleucina que é cruzada com uma outra planta para fornecer uma progênie que é tolerante ao glifosato.

[00010] Em um outro aspecto da invenção, é fornecido um método para controlar ervas daninhas em um campo de plantas de cultivo, em que o campo de plantas de cultivo é tratado com uma quantidade eficiente de um herbicida que contém glifosato e as plantas de cultivo contêm um cassete de expressão vegetal que possui um gene EPSPS modificado que codifica uma proteína EPSPS que possui isoleucina ou leucina na posição 102 e um aminoácido na posição 106 selecionado do grupo que consiste em treonina, glicina, cisteína, alanina e

isoleucina.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00011] Figura 1. Seqüência de polinucleotídeo codificadora e complementar de SEQ ID NOs: 47 e 48 respectivamente, e de polipeptídeo da EPSPS do milho.

[00012] Figura 2. Alinhamento dos polipeptídeos de EPSPS sintases vegetais e bacterianas de classe I (SEQ ID NOs: 49-52).

[00013] Figura 3. Mapa de constructo do DNA de pMON70461 (EPSPS do tipo selvagem).

[00014] Figura 4. Seqüências iniciadoras de DNA.

[00015] Figura 5. Mapa de constructo do DNA de pMON58452 (variação ZmTIPT).

[00016] Figura 6. Mapa de constructo do DNA de pMON30167 (EPSPS CP4).

[00017] Figura 7. Mapa de constructo do DNA de pMON70472 (variação ZmTIPT).

[00018] Figura 8. Mapa de constructo do DNA de pMON70475 (variação ZmTIPA).

[00019] Figura 9. Mapa de constructo do DNA de pMON70467 (variação ZmPT).

[00020] Figura 10. Mapa de constructo do DNA de pMON81519 (variação ZmTIPT).

[00021] Figura 11. Mapa de constructo do DNA de pMON81548 (variação LsTIPA).

[00022] Figura 12. Mapa de constructo do DNA de pMON58491 (variação de AtTIPA).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00023] A presente invenção se baseia, em parte, no constructo de uma EPSPS resistente ao glifosato e na utilização de moléculas de DNA que codificam a EPSPS em um constructo de DNA para fornecer

tolerância ao herbicida para as plantas transgênicas que expressam a EPSPS resistente ao glifosato em seus tecidos. As descrições a seguir são fornecidas para definir melhor a presente invenção e para guiar os versados na técnica na prática da presente invenção. A não ser que seja citado de outra forma, os termos devem ser entendidos de acordo com o uso convencional pelos versados comuns na técnica relevante. As definições de termos comuns na biologia molecular podem ser também encontradas em Rieger e outros, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5a edição, Springer-Verlag; Nova York, (1991); e Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nova York, (1994). A nomenclatura para as bases do DNA que são apresentadas em 37 CFR § 1.822 é utilizada. "Ácido nucléico" se refere ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e ao ácido ribonucleico (RNA). A nomenclatura padronizada de uma única letra ou de três letras para os resíduos de aminoácidos é utilizada.

[00024] Os métodos da presente invenção incluem o planejamento de proteínas EPSPS que conferem uma característica de tolerância ao glifosato para as plantas nas quais são introduzidas. As moléculas de polinucleotídeos que codificam as proteínas envolvidas na tolerância ao herbicida são conhecidas na arte e incluem, mas não estão limitadas a uma molécula de polinucleotídeo que codifica a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS, descrita nas Patentes U.S. Nos 5.627.061, 5.633.435 e 6.040.497; Padgett e outros *Herbicide Resistant Crops*, Lewis Publishers, 53-85, 1996; e Penaloza-Vazquez e outros *Plant Cell Reports* 14:482-487, 1995; e *aroA* (Patente U.S. No 5.094.945) para a tolerância ao glifosato.

[00025] "Glifosato" se refere à N-fosfonometilglicina e seus sais. O glifosato é o ingrediente ativo do herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Os tratamentos vegetais com o "glifosato" se referem aos tratamentos com a formulação herbicida do Roundup® ou do Roundup Ultra®, a não ser que seja citado de outra forma. O glifosato na forma de N-

fosfonometilglicina e seus sais (herbicida Roundup® não-formulado) é constituído de componentes de meios de cultura sintéticos utilizados para a seleção de tolerância de bactérias e de vegetais ao glifosato ou utilizados para determinar a resistência da enzima em ensaios bioquímicos in vitro. Os exemplos de formulações comerciais do glifosato incluem, sem restrição, as vendidas pela Monsanto Company na forma dos herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® e ACCORD®, dos quais todos contêm glifosato como seu sal de isopropilamônio; as vendidas pela Monsanto Company na forma dos herbicidas ROUNDUP® DRY e RIVAL®, que contêm glifosato como seu sal de amônio; as vendidas pela Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, que contém o glifosato como seu sal de sódio; e as vendidas pela Zeneca Limited na forma do herbicida TOUCHDOWN®, que contém glifosato como seu sal de trimetilsulfônio.

[00026] Através dos métodos de engenharia genética de plantas, é possível produzir plantas tolerantes ao glifosato através da inserção no genoma da planta de uma molécula de DNA que causa a produção de níveis superiores de EPSPS do tipo selvagem (Patente U.S. No 4.940.835; Shah e outros, Science 233: 478-481, 1986). A tolerância ao glifosato também pode ser conseguida através da expressão de variações da EPSPS que possuem menor afinidade pelo glifosato e, portanto, mantêm a sua atividade catalítica na presença do glifosato, por exemplo, aroA P-S (Patente U.S. No 5.094.945), CP4 EPSPS (Patente U.S. No 5.633.435), TIPS do milho (Patente U.S. No 6.040.497), variações 101/192 e 101/144 (Patente U.S. No 5.866.775 e Patente U.S. No 6.225.112, Howe e outros, Mol. Breeding 10: 153-164, 2002). Por exemplo, a tolerância ao glifosato foi engenheirada geneticamente no milho (Patentes U.S. Nos 5.554.798, 6.040.497), no

trigo (Zhou e outros Plant Cell Rep. 15: 159-163, 1995), na soja (WO 9200377), no algodão (WO 0234946) e na canola (WO 9204449).

[00027] Foram isoladas variações da enzima EPSPS do tipo selvagem que são resistentes ao glifosato como um resultado de alterações na sequência codificadora dos aminoácidos da EPSPS (Kishore e outros, Annu. Rev. Biochem. 57: 627-663, 1988; Schulz e outros, Arch. Microbiol. 137: 121-123, 1984; Sost e outros, FEBS Lett. 173: 238-241, 1984; Kishore e outros, Em "Biotechnology for Crop Protection" ACS Symposium No de Série 379 eds. Hedlin e outros, 37-48, 1988). Estas variações possuem tipicamente um K_i maior para o glifosato que a enzima EPSPS do tipo selvagem que confere o fenótipo de tolerância ao glifosato, mas estas variações também são caracterizadas por um K_m alto para PEP que torna a enzima cineticamente menos eficiente. Por exemplo, o K_m aparente para PEP e o K_i evidente para o glifosato para a EPSPS nativa de *E. coli* são de 10 μM e 0,5 μM enquanto que para um isolado resistente ao glifosato que possui uma única substituição de aminoácido de uma alanina para a glicina na posição 96 estes valores são de 220 μM e 4,0 mM, respectivamente. A Patente U.S. No 6.040.497 relata que a variação da EPSPS, conhecida como a mutação TIPS (uma substituição da isoleucina pela treonina na posição de aminoácido 102 e uma substituição da serina pela prolina na posição de aminoácido 106) compreende duas mutações que quando introduzidas na sequência polipeptídica da EPSPS de *Zea mays* conferem resistência ao glifosato à enzima. As plantas transgênicas que contêm esta enzima mutante são tolerantes ao glifosato. Podem ser produzidas mutações idênticas nos genes que codificam as enzimas EPSPS sensíveis ao glifosato provenientes de outras fontes para criar enzimas resistentes ao glifosato. A mutagênese direcionada ao sítio *in vitro* de moléculas de DNA demonstrou claramente a utilidade para a introdução de alterações

específicas em uma sequência de DNA de um genoma e outros métodos sob desenvolvimento podem fornecer ainda métodos de mutagênese direcionada ao sítio in situ (Pub. de Patente U.S. 20020151072). Estes métodos podem ser utilizados para gerar as sequências codificadoras de DNA que codificam as variações de EPSPS resistentes ao glifosato da presente invenção no contexto do gene EPSPS endógeno da célula hospedeira.

[00028] A presente invenção fornece substituições de aminoácidos em uma EPSPS de classe I que demonstra maior resistência ao glifosato em relação a quaisquer EPSPSs modificadas de classe I. A presente invenção se refere especificamente a certas variações duplas das EPSPSs de classe I que são resistentes ao glifosato, mas ainda mantêm um nível funcional de atividade de ligação ao substrato de PEP. Durante o desenvolvimento das novas variações duplas da EPSPSs de classe I para resistência ao glifosato, foi necessário construir um número de variações isoladas úteis como controles para o ensaio e para a demonstração de que a variação dupla é necessária para a obtenção tanto de uma enzima resistente ao glifosato quanto de uma enzima que ainda mantém um nível suficiente de atividade de ligação ao substrato para servir como uma substituição funcional para uma EPSPS de classe I nativa.

[00029] A enzima EPSPS funciona no cloroplasto vegetal, portanto, peptídeos de trânsito de cloroplastos (CTP) são engenheirados em uma molécula de DNA para codificar uma fusão do CTP no terminal N de uma EPSPS criando uma molécula quimérica. Um ácido polinucleico quimérico que codifica a sequência é compreendido de dois ou mais quatros abertos de leitura ligados em quadro que codificam uma proteína quimérica, por exemplo, um peptídeo de trânsito de cloroplastos e uma enzima EPSPS. Um gene quimérico se refere a vários elementos genéticos derivados de fontes heterólogas ligadas de

forma operacional para compreender um gene. O CTP se dirige à enzima resistente ao glifosato no cloroplasto vegetal. No gene EPSPS vegetal nativo, as regiões de peptídeos de trânsito de cloroplastos ficam contidas na sequência codificadora nativa (por exemplo, CTP2, Klee e outros, Mol. Gen. Genet. 210: 47-442, 1987). O CTP é clivado da enzima EPSPS na membrana do cloroplasto para criar uma "EPSPS madura ou enzima EPSPS" que se refere à sequência de polipeptídeo do produto protéico processado remanescente após o peptídeo de trânsito de cloroplasto ter sido removido.

[00030] O CTP nativo pode ser substituído por um CTP heterólogo durante o constructo de um cassete de expressão vegetal de transgene. Muitas proteínas localizadas no cloroplasto, incluindo a EPSPS, são expressas partindo de genes nucleares como precursores e são direcionadas para o cloroplasto por um peptídeo de trânsito do cloroplasto (CTP) que é removido durante as etapas de importação. Os exemplos de outras tais proteínas de cloroplastos incluem a subunidade pequena (SSU) da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (rubisco), a ferredoxina, a ferredoxina oxidoredutase, a proteína I e a proteína II do complexo de captação de luz e a tiorredoxina F. Foi demonstrado in vivo e in vitro que as proteínas que não são do cloroplasto podem ser direcionadas para o cloroplasto através do uso de fusões de proteínas com um CTP e que uma sequência de CTP é suficiente para direcionar uma proteína para o cloroplasto. Foi mostrado que a incorporação de um peptídeo de trânsito de cloroplasto adequado, tal como, o CTP da EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee e outros, Mol. Gen. Genet. 210: 437-442 (1987) e o CTP da EPSPS da *Petunia hybrida* (della-Cioppa e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6873-6877 (1986) direciona a proteína EPSPS heteróloga para os cloroplastos em plantas transgênicas. A produção de plantas tolerantes ao glifosato através da expressão de uma proteína de fusão que compreende um CTP amino

terminal com uma enzima EPSPS resistente ao glifosato é bem conhecida pelos versados na técnica, (Patente U.S. No 5.627.061, Patente U.S. No 5.633.435, Patente U.S. No 5.312.910, EP 0218571, EP 189707, EP 508909 e EP 924299). Os versados na técnica reconhecerão que podem ser feitas várias constructos quiméricas que utilizam a funcionalidade de um CTP particular para importar enzimas EPSPS resistentes ao glifosato para o cloroplasto de células vegetais.

[00031] A modificação e as alterações podem ser feitas na estrutura dos polinucleotídeos de DNA da invenção e ainda se obter uma molécula de DNA que transcreve um mRNA que codifica a proteína EPSPS funcional modificada da presente invenção. As substituições de aminoácidos descritas aqui fornecem uma característica melhorada para a proteína, por exemplo, EPSPS sintase melhorada resistente ao glifosato. As substituições de aminoácidos ou as variações de aminoácidos, são preferencialmente substituições de um único resíduo de aminoácido por um outro resíduo de aminoácido em uma ou mais posições dentro da proteína. As substituições, as deleções, as inserções e qualquer combinação das mesmas podem ser feitas para chegar em um constructo final. A presente invenção envolve a substituição de aminoácidos em uma proteína EPSPS de classe I para fornecer uma nova característica da proteína, tal como, a resistência ao glifosato.

[00032] Sabe-se que o código genético é degenerado. Os aminoácidos e seu(s) códon(s) de RNA estão listados abaixo na Tabela 1.

TABELA 1. Aminoácidos e os códons de RNA que os codificam.

<u>Aminoácido</u>	<u>Códons</u>
Nome completo; código de 3 letras; código de 1 letra	
Alanina; Ala; A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína; Cys; C	UGC UGU
Ácido aspártico; Asp; D	GAC GAU
Ácido glutâmico; Glu; E	GAA GAG
Fenilalanina; Phe; F	UUC UUU
Glicina; Gly; G	GGA GGC GGG GGU
Histidina; His; H	CAC CAU
Isoleucina; Ile; I	AUA AUC AUU
Lisina; Lys; K	AAA AAG
Leucina; Leu; L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina; Met; M	AUG
Asparagina; Asn; N	AAC AAU
Prolina; Pro; P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina; Gin; Q	CAA CAG
Arginina; Arg; R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina; Arg; R	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina; Thr; T	ACA ACC ACG ACU
Valina; Val; V	GUA GUC GUG GUU
Triptofano; Trp; W	UGG
Tirosina; Tyr; Y	UAC UAU

[00033] Os códons são descritos em termos de bases de RNA, por exemplo, adenina, uracila, guanina e citosina, é o mRNA que é traduzido diretamente em polipeptídeos. É entendido que quando se planeja um polinucleotídeo de DNA para uso em um constructo, as bases de DNA seriam substituídas, por exemplo, timina ao invés de uracila. O códon se refere a uma sequência de três nucleotídeos que especifica um

aminoácido particular. O uso de códons ou "preferência de códons" se refere à frequência de uso dos códons que codificam os aminoácidos nas seqüências codificadoras de organismos. Uma tabela de uso de códons seria consultada quando se seleciona códons para substituição para uma seqüência artificial de DNA. A seqüência de códons fornece uma seqüência codificadora que se refere à região dos tripletos de ácidos nucléicos seqüenciais contínuos que codificam uma proteína, um polipeptídeo ou uma seqüência peptídica. O termo "DNA codificador" se refere ao DNA cromossômico, ao DNA plasmideal, ao cDNA ou ao polinucleotídeo de DNA que codifica qualquer uma das proteínas discutidas aqui. "Plasmídeo" se refere a um pedaço auto-replicante extracromossômico circular de DNA.

[00034] O termo "endógeno" se refere a materiais que se originam de dentro de um organismo ou célula. "Exógeno" se refere a materiais que se originam de fora de um organismo ou célula. Isto se aplica tipicamente às moléculas de ácido nucléico utilizadas na produção de células e plantas hospedeiras transformadas ou transgênicas.

[00035] O termo "genoma" como se aplica às bactérias abrange tanto o cromossomo e os plasmídeos dentro de uma célula hospedeira bacteriana. Os ácidos nucléicos codificadores da presente invenção introduzidos nas células hospedeiras bacterianas podem, portanto, estar integrados nos cromossomos ou localizados nos plasmídeos. O termo "genoma" como se aplica às células vegetais abrange não somente o DNA cromossômico encontrado dentro do núcleo, mas o DNA da organela encontrado dentro dos componentes subcelulares da célula. O termo "gene" se refere a ácidos polinucleicos que compreendem o DNA cromossômico, o DNA plasmideal, o cDNA, um polinucleotídeo de DNA artificial ou outro DNA que é transcrito em uma molécula de RNA, em que o RNA pode codificar um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína e os elementos genéticos que flanqueiam

a seqüência codificadora que estão envolvidos na regulação da expressão do mRNA ou do polipeptídeo da presente invenção. Um "fragmento" de um gene é uma parte de uma molécula de ácido polinucleico de comprimento completo que possui pelo menos um comprimento mínimo capaz de transcrição em um RNA, de tradução em um peptídeo ou de ser útil como uma sonda ou iniciador em um método de detecção de DNA.

[00036] Os ácidos polinucleicos da presente invenção introduzidos nas células vegetais podem, portanto, estar integrados nos cromossomos ou localizados em organelas. As EPSPSs modificadas da presente invenção são direcionadas para o cloroplasto através de um peptídeo de trânsito de cloroplasto no terminal N da seqüência codificadora. Alternativamente, o gene que codifica as EPSPSs modificadas pode estar integrado no genoma do cloroplasto, eliminando assim a necessidade de um peptídeo de trânsito de cloroplasto.

[00037] Uma seqüência de "DNA heteróloga" se refere a uma seqüência de polinucleotídeo que se origina de uma fonte ou espécie estranha ou, se for da mesma origem, é modificada de sua forma original. "DNA homólogo" se refere ao DNA da mesma origem que aquele da célula receptora.

[00038] "Hibridização" se refere à capacidade de um filamento de ácido nucleico de se ligar com um filamento complementar através do pareamento de bases. A hibridização ocorre quando seqüências complementares nos dois filamentos de ácido nucleico se ligam uma às outras. As sondas e os iniciadores de ácidos nucleicos da presente invenção se hibridizam sob condições rigorosas com uma seqüência de DNA alvo. Qualquer método de hibridização ou de amplificação convencional de ácidos nucleicos pode ser utilizado para a identificação da presença de DNA proveniente de um evento transgênico em uma amostra. Um "evento" transgênico é produzido através da

transformação de uma célula vegetal com o DNA heterólogo, isto é, um constructo de ácido nucléico que inclui um transgene de interesse; da regeneração de uma população de plantas resultante da inserção do transgene no genoma da célula vegetal e da seleção de uma planta particular caracterizada pela inserção em uma localização particular do genoma. O termo "evento" se refere à planta transformante original e à progênie da transformante que incluem o DNA heterólogo. O termo "evento" também inclui a progênie produzida através do cruzamento sexual entre o evento e uma outra planta em que a progênie inclui o DNA heterólogo. As moléculas de ácidos nucléicos ou os fragmentos das mesmas são capazes de se hibridizar especificamente a outras moléculas de ácidos nucléicos sob certas circunstâncias. Como utilizado aqui, é dito que duas moléculas de ácidos nucléicos são capazes de se hibridizar especificamente uma com a outra se as duas moléculas forem capazes de formar uma estrutura de ácido nucléico de filamento duplo antiparalela. É dito que uma molécula de ácido nucléico é o "complemento" de uma outra molécula de ácido nucléico se exibirem complementaridade completa. Como utilizado aqui, é dito que as moléculas exibem "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das moléculas for complementar a um nucleotídeo da outra. É dito que duas moléculas são "minimamente complementares" se puderem se hibridizar uma com a outra com estabilidade suficiente para permitir que permaneçam aneladas uma com a outra sob pelo menos condições de "baixo rigor" convencionais. Similarmente, é dito que as moléculas são "complementares" se puderem se hibridizar uma com a outra com estabilidade suficiente para permitir que permaneçam aneladas uma com a outra sob condições de "alto rigor" convencionais. As condições rigorosas convencionais são descritas por Sambrook e outros, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

Nova York (1989), referido aqui como Sambrook e outros, (1988) e Haymes e outros, Em: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Desvios da complementaridade completa são, portanto, permitidas, contanto que tais desvios não impeçam completamente a capacidade das moléculas de formar uma estrutura de filamento duplo. Para que uma molécula de ácido nucléico sirva como um iniciador ou uma sonda, é necessário que seja somente suficientemente complementar em seqüência para ser capaz de formar uma estrutura de filamento duplo estável sob o solvente particular e as concentrações empregadas de sais.

[00039] Como utilizado aqui, uma seqüência substancialmente homóloga é uma seqüência de ácido nucléico que se hibridizará especificamente com o complemento da seqüência de ácido nucléico com a qual está sendo comparada sob condições de alto rigor. O termo "condições rigorosas" é funcionalmente definido em relação à hibridização de uma sonda de ácido nucléico com um ácido nucléico alvo (tal como, com uma seqüência de ácido nucléico particular de interesse) através do procedimento de hibridização específica discutido em Sambrook e outros, 1989, em 9.52-9.55. Ver também, Sambrook e outros, 1989 em 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa, (Nucl. Acids. Res. 12: 203-213, 1984); e Wetmur e Davidson, (J. Mol. Biol. 31: 349-370, 1988). Conseqüentemente, as seqüências de nucleotídeos da invenção podem ser utilizadas em relação a sua capacidade de formar seletivamente moléculas em duplex com filamentos complementares de fragmentos de DNA. Dependendo da aplicação imaginada, poderá ser desejado empregar condições variáveis de hibridização para atingir graus variáveis de seletividade da sonda em relação à seqüência alvo. Para as aplicações que requerem alta seletividade, pode ser tipicamente desejado empregar condições relativamente rigorosas para formar os híbridos, por exemplo, poderão ser empregadas condições de baixo teor

de sais e/ou de alta temperatura, tal como as fornecidas por aproximadamente 0,02 M até aproximadamente 0,15 M NaCl a temperaturas de aproximadamente 50°C até aproximadamente 70°C. Uma condição rigorosa, por exemplo, é lavar o filtro de hibridização pelo menos duas vezes com tampão de lavagem de alto rigor (0,2 X SSC, 0,1% de SDS, 65°C). As condições rigorosas apropriadas que promovem a hibridização do DNA, por exemplo, 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50°C, são conhecidas pelos versados na técnica ou podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por exemplo, a concentração de sais na etapa de lavagem pode ser selecionada de um baixo rigor de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C até um alto rigor de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Em adição, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de condições de baixo rigor à temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, até condições de alto rigor a aproximadamente 65°C. Tanto a temperatura quanto o sal podem ser variados ou a temperatura ou a concentração de sais pode ser mantida enquanto a outra variável é alterada. Tais condições seletivas toleram pouco, se algum, pareamento errado entre a sonda e o molde ou o filamento de alvo. A detecção de moléculas de DNA através da hibridização é bem conhecida pelos versados na técnica e os ensinamentos das Patentes U.S. Nos 4.965.188 e 5.176.995 são exemplos dos métodos de análises de hibridização.

[00040] "Identidade" se refere ao grau de similaridade entre duas seqüências de ácidos polinucléicos ou protéicas. Um alinhamento das duas seqüências é realizado através de um programa de computador adequado. Um programa de computador amplamente utilizado e aceito para a realização dos alinhamentos de seqüências é o CLUSTALW v1.6 (Thompson e outros, Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680, 1994). O número

de bases ou de aminoácidos combinados é dividido pelo número total de bases ou de aminoácidos e multiplicado por 100 para a obtenção de uma identidade percentual. Por exemplo, se duas seqüências de 580 pares de bases tiverem 145 bases combinadas, estas teriam uma identidade percentual de 25. Se as duas seqüências comparadas tiverem comprimentos diferentes, o número de combinações é dividido pelo menor dos dois comprimentos. Por exemplo, se houver 100 aminoácidos combinados entre proteínas de 200 e de 400 aminoácidos, estas são 50 por cento idênticas em relação à seqüência mais curta. Se a seqüência mais curta for menor que 150 bases ou 50 aminoácidos de comprimento, o número de combinações é dividido por 150 (para as bases de ácidos nucléicos) ou por 50 (para os aminoácidos) e multiplicado por 100 para a obtenção de uma identidade percentual.

[00041] "Íntron" se refere a um elemento genético que é uma parte de um gene não-traduzida em proteína, muito embora esta seja transcrita em RNA, a seqüência intrônica sendo "excluída por processamento" do RNA mensageiro maduro.

[00042] Uma molécula de ácido nucléico "isolada" é substancialmente separada de outras seqüências de aminoácidos com as quais o ácido nucléico está normalmente associado, tal como, do DNA cromossômico ou extracromossômico de uma célula em que o ácido nucléico ocorre naturalmente. Uma molécula de ácido nucléico é uma molécula de ácido nucléico isolada quando compreende um transgene ou uma parte de um transgene presente no genoma de um outro organismo. O termo também abrange ácidos nucléicos que são bioquimicamente purificados de forma a remover substancialmente os ácidos nucléicos e os outros componentes celulares contaminantes. O termo "transgene" se refere a qualquer molécula de ácido polinucleico não-nativa a uma célula ou a um organismo transformada na célula ou no organismo. "Transgene" também abrange as partes componentes de

um gene vegetal nativo modificado pela inserção de uma molécula de ácido polinucleico não-nativa através da recombinação direcionada ou da mutação específica ao sítio.

[00043] Polipeptídeos "Isolados", "Purificados", "Homogêneos". Um polipeptídeo é "isolado" se tiver sido separado dos componentes celulares (ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e outros polipeptídeos) que acompanham naturalmente o mesmo ou que é sintetizado quimicamente ou é recombinante. Uma molécula de polipeptídeo é uma molécula de polipeptídeo isolada quando esta for expressa partindo de um transgene em um outro organismo. Um polipeptídeo monomérico é isolado quando pelo menos 60% em peso de uma amostra é composto do polipeptídeo, preferencialmente 90% ou mais, mais preferencialmente 95% ou mais e mais preferencialmente mais de 99%. A pureza ou a homogeneidade da proteína é indicada, por exemplo, através da eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguida pela visualização de uma única banda de polipeptídeo após a coloração do gel de poliacrilamida; cromatografia líquida em alta pressão; ou outros métodos convencionais. As proteínas podem ser purificadas através de qualquer um dos meios conhecidos na arte, por exemplo, como descrito em *Guide to Protein Purification*, ed. Deutscher, Meth. Enzymol. 185, Academic Press, São Diego, 1990; e *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice*, Springer Verlag, Nova York, 1982.

[00044] O termo "nativo" se refere de forma geral a um ácido polinucleico ou polipeptídeo que ocorre naturalmente ("do tipo selvagem"). Entretanto, no contexto da presente invenção uma modificação de um polinucleotídeo e de um polipeptídeo isolados nativos ocorreu para fornecer um polipeptídeo variante com um fenótipo particular, por exemplo, uma substituição de aminoácido em uma EPSPS nativa sensível ao glifosato para fornecer uma EPSPS

resistente ao glifosato. O polinucleotídeo modificado desta maneira é não-nativo em relação aos elementos genéticos encontrados normalmente ligados a um polinucleotídeo não-modificado que ocorre naturalmente.

[00045] Utilizando métodos bem conhecidos, o perito na arte pode facilmente produzir variações de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de genes e de proteínas que fornecem um produto gênico modificado. Por exemplo, as moléculas de DNA "variantes" da presente invenção são moléculas de DNA que contêm alterações na seqüência codificadora de EPSPS, tais como, alterações que incluem um ou mais nucleotídeos de uma seqüência codificadora nativa de EPSPS que estão sendo deletados, adicionados e/ou substituídos, de forma que cada gene variante de EPSPS codifica uma proteína modificada que mantém a atividade da EPSPS e é agora resistente ao herbicida glifosato. As moléculas de DNA variantes podem ser produzidas, por exemplo, através de técnicas padronizadas de mutagênese de DNA ou através da síntese química da molécula variante de DNA ou de uma parte do mesmo. Os métodos para a síntese química dos ácidos nucléicos são discutidos, por exemplo, em Beaucage e outros, Tetra. Letts. 22: 1859-1862 (1981) e Matteucci e outros, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-(1981). A síntese química de ácidos nucléicos pode ser realizada, por exemplo, em sintetizadores de oligonucleotídeos automatizados. Tais variações preferencialmente não alteram o quadro de leitura da região codificadora de proteínas do ácido nucléico. A presente invenção também abrange fragmentos de uma proteína que não possui pelo menos um resíduo de uma proteína de comprimento completo, mas que substancialmente mantém a atividade da proteína.

[00046] Uma primeira molécula de ácido nucléico está "ligada de forma operacional" com uma segunda molécula de ácido nucléico quando a primeira molécula de ácido nucléico é colocada em uma

relação funcional com a segunda molécula de ácido nucléico. Por exemplo, um promotor está ligado de forma operacional a uma seqüência de ácido nucléico codificadora de proteínas se o promotor efetuar a transcrição ou a expressão da seqüência codificadora. Geralmente, as moléculas de DNA ligadas de forma operacional estão contíguas e, quando necessário unem duas regiões codificadoras de proteínas, em quadro de leitura.

[00047] O termo "planta" abrange qualquer planta superior e progênie da mesma, incluindo monocotiledôneas (por exemplo, milho, arroz, trigo, cevada etc.), dicotiledôneas (por exemplo, soja, algodão, canola, tomate, batata, *Arabidopsis*, tabaco etc.), gimnospermas (pinheiros, abetos, cedros etc.) e inclui partes de plantas, incluindo unidades reprodutivas de uma planta (por exemplo, sementes, bulbos, tubérculos, frutos, flores etc.) ou outras partes ou tecidos partindo dos quais a planta pode ser reproduzida.

[00048] "Sinal de poliadenilação" ou "sinal de poliA" se refere a uma seqüência de ácido nucléico localizada a 3' em relação a uma região codificadora que causa a adição de nucleotídeos adenilados na extremidade a 3' do mRNA transcrito partindo da região codificadora.

[00049] "Reação em cadeia da polimerase (PCR)" se refere a um método de amplificação do DNA que utiliza uma técnica enzimática para criar várias cópias de uma seqüência de ácido nucléico (amplicon). As cópias de uma molécula de DNA são preparadas através do vai e vem de uma DNA polimerase entre dois amplímeros. A base deste método de amplificação é constituída de vários ciclos de alterações de temperatura para desnaturar, então reanelar amplímeros (moléculas de iniciador de DNA), seguidos pela extensão para sintetizar novos filamentos de DNA na região localizada entre os amplímeros flanqueadores. A amplificação de ácidos nucléicos pode ser realizada através de qualquer um dos vários métodos de amplificação de ácidos

nucléicos conhecidos na arte, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma variedade de métodos de amplificação é conhecida na técnica e é descrita, inter alia, nas Patentes U.S. Nos 4.683.195 e 4.683.202 e em PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis e outros, Academic Press, São Diego, 1990. Os métodos de amplificação da PCR foram desenvolvidos para a amplificação de até 22 kb de DNA genômico e até 42 kb de DNA de bacteriófago (Cheng e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994). Estes métodos assim como outros métodos conhecidos na arte da amplificação do DNA podem ser utilizados na prática da presente invenção.

[00050] O termo "promotor" ou "região promotora" se refere a uma molécula de ácido polinucleico que funciona como um elemento regulador, geralmente encontrado a montante (5') de uma seqüência codificadora, que controla a expressão da seqüência codificadora através do controle da produção de RNA mensageiro (mRNA) através do fornecimento do sítio de reconhecimento para a RNA polimerase e/ou de outros fatores necessários para iniciar a transcrição no sítio correto. Como considerado aqui, um promotor ou uma região promotora inclui variações de promotores derivadas através da ligação com várias seqüências reguladoras, da mutagênese aleatória ou controlada e da adição ou da duplicação de seqüências intensificadoras. A região descrita divulgada aqui e os equivalentes biologicamente funcionais da mesma, são responsáveis pelo controle da transcrição de seqüências codificadoras sob seu controle quando introduzida em um hospedeiro como parte de um constructo de DNA recombinante adequada, como demonstrado através de sua capacidade de produzir mRNA.

[00051] Um ácido nucleico "recombinante" é produzido através da combinação de dois segmentos separados de outra maneira de seqüência de ácido nucleico, por exemplo, através da síntese química

ou através da manipulação de segmentos isolados de ácidos polinucleicos através de técnicas da engenharia genética. O termo "constructo de DNA recombinante" se refere a qualquer agente tal como um plasmídeo, um cosmídeo, um vírus, uma seqüência que se replica de forma autônoma, um fago ou uma seqüência de nucleotídeos de DNA ou de RNA de filamento simples ou de filamento duplo linear ou circular, derivada de qualquer origem, capaz de se integrar no genoma ou de se replicar de forma autônoma, que compreende uma molécula de DNA na qual uma ou mais seqüências de DNA foram ligadas de uma maneira funcionalmente operadora. Tais constructos de DNA recombinante são capazes de introduzir uma seqüência reguladora a 5' ou uma região promotora e uma seqüência de DNA para um produto gênico selecionado em uma célula de tal maneira que a seqüência de DNA é transcrita em um mRNA funcional que é traduzido e, portanto, expresso. As constructos de DNA recombinante podem ser produzidas para serem capazes de expressar RNAs anti-senso ou RNA anti-senso de filamento duplo estabilizado com a finalidade de inibir a expressão de um RNA alvo específico de interesse.

[00052] "Resistência" se refere a uma enzima que é capaz de funcionar na presença de uma toxina, por exemplo, as EPSP sintases de classe II resistentes ao glifosato que ocorrem naturalmente resistentes ao glifosato ou uma enzima EPSPS modificada que possui atividade catalítica que não é afetada por um herbicida a uma concentração que normalmente interromperia a mesma atividade na enzima do tipo selvagem, por exemplo, as EPSP sintases de classe I modificadas da presente invenção. Uma enzima que possui resistência a um herbicida pode também ter a função de desintoxicação do herbicida, por exemplo, a fosfinotricina acetiltransferase e a glifosato oxidoreductase.

[00053] "Marcador selecionável" se refere a uma molécula de ácido

polinucleico que codifica uma proteína, que confere um fenótipo que facilita a identificação de células que contêm a molécula de ácido polinucleico. Os marcadores selecionáveis incluem os genes que conferem resistência a antibióticos (por exemplo, ampicilina, canamicina), complementam uma deficiência nutricional (por exemplo, uracila, histidina, leucina) ou conferem uma característica que pode ser distinguida visualmente (por exemplo, alterações de cor ou fluorescência). Os genes marcadores selecionáveis dominantes úteis incluem genes que codificam genes de resistência a antibióticos (por exemplo, neomicina fosfotransferase, npt); e genes de resistência a herbicidas (por exemplo, fosfinotricina acetiltransferase, EPSP sintase de classe II, EPSPS sintase de classe I modificada). Uma estratégia útil para a seleção de transformantes em relação à resistência a herbicidas é descrita, por exemplo, em Vasil, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vols. I-III, Laboratory Procedures and Their Applications Academic Press, Nova York (1984).

[00054] Um "polinucleotídeo artificial" como utilizado na presente invenção é uma seqüência de DNA planejada de acordo com os métodos da presente invenção e criada na forma de uma molécula de DNA isolada para uso em um constructo de DNA que fornece expressão de uma proteína em células hospedeiras ou para as finalidades de clonagem em constructos apropriadas ou outros usos conhecidos pelos versados na técnica. Programas de computador estão disponíveis para estas finalidades, incluindo, mas não limitados aos programas "BestFit" ou "Gap" do Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group (GCG), Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI 53711. O polinucleotídeo artificial pode ser criado por um ou mais métodos conhecidos na arte, que incluem, mas não estão limitados: à PCR de sobreposição. Um polinucleotídeo artificial como utilizado aqui, não ocorre naturalmente e

pode ser substancialmente divergente de outros polinucleotídeos que codificam a proteína idêntica ou quase idêntica.

EXPRESSÃO DE UMA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA EPSPS DE CLASSE I MODIFICADA EM PLANTAS

[00055] São produzidas constructos de DNA que contêm vários elementos genéticos necessários para a expressão da sequência codificadora da EPSPS em plantas. "Constructo de DNA" se refere a elementos genéticos ligados de forma operacional a cada outro constructo de uma molécula de DNA recombinante e pode compreender elementos que fornecem a expressão de uma molécula de polinucleotídeo de DNA em uma célula hospedeira e elementos que fornecem a manutenção do constructo na célula hospedeira. Um cassete de expressão vegetal compreende a ligação operacional de elementos genéticos que quando transformado em uma célula vegetal fornece a expressão de um produto gênico desejável. "Cassete de expressão vegetal" se refere a segmentos quiméricos de DNA que compreendem elementos reguladores que estão ligados de forma operacional para fornecer a expressão de um produto transgênico em plantas. Promotores, líderes, íntrons, ácidos nucleicos que codificam peptídeos de trânsito, regiões de término da transcrição a 3' são todos elementos genéticos que podem ser ligados de forma operacional pelos versados na técnica da biologia molecular para fornecer um nível desejável de expressão ou de funcionalidade para uma EPSPS de classe I resistente ao glifosato da presente invenção. Umo constructo de DNA pode conter um ou mais cassetes de expressão vegetal que expressam as moléculas de DNA da presente invenção ou outras moléculas de DNA úteis na engenharia genética das plantas de cultivo.

[00056] Uma variedade de promotores especificamente ativos em tecidos vegetativos, tais como folhas, caules, raízes e tubérculos, pode ser utilizada para expressar as moléculas de ácidos polinucleicos da

EPSPS da presente invenção. Os exemplos de promotores específicos aos tubérculos incluem, mas não estão limitados aos promotores da patatina das classes I e II (Bevan e outros, EMBO J. 8: 1899-1906, 1986; Koster-Topfer e outros, Mol Gen Genet. 219: 390-396, 1989; Mignery e outros, Gene. 62: 27-44, 1988; Jefferson e outros, Plant Mol. Biol. 14: 995-1006, 1990), o promotor para os genes ADPGPP do tubérculo da batata, ambas as subunidades grande e pequena; o promotor da sacarose sintase (Salanoubat e Belliard, Gene. 60: 47-56, 1987; Salanoubat e Belliard, Gene 84: 181-185, 1989); e o promotor para as proteínas principais de tubérculo incluindo os complexos protéicos de 22 kd e os inibidores da proteinase (Hannapel, Plant. Physiol. 101: 703-704, 1993). Os exemplos de promotores específicos às folhas incluem, mas não estão limitados aos promotores da ribulose bifosfato carboxilase (RBCS ou RuBISCO) (ver, por exemplo, Matsuoka e outros, Plant J. 6: 311-319, 1994); o promotor do gene da proteína de ligação da clorofila a/b que coleta luz (ver, por exemplo, Shiina e outros, Plant Physiol. 115: 477-483, 1997; Casal e outros, Plant Physiol. 116: 1533-1538, 1998); e o promotor do gene relacionado a myb de Arabidopsis thaliana (Atmyb5) (Li e outros, FEBS Lett. 379: 117-121, 1996). Os exemplos de promotores específicos às raízes incluem, mas não estão limitados ao promotor para o gene da quitinase ácida (Samac e outros, Plant Mol. Biol. 25: 587-596, 1994); os subdomínios específicos às raízes do promotor CaMV35S que foram identificados (Lam e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 7890-7894, 1989); o promotor da ORF13 de Agrobacterium rhizogenes que exibe alta atividade nas raízes (Hansen e outros, Mol. Gen. Genet. 254: 337-343 (1997); o promotor para o gene específico à raiz do tabaco TobRB7 (Yamamoto e outros, Plant Cell 3: 371-382, 1991); e os promotores específicos às células de raiz relatados por Conkling e outros (Conkling e outros, Plant Physiol. 93: 1203-1211, 1990).

[00057] Uma outra classe útil de promotores específicos aos tecidos vegetativos contém os promotores meristemáticos (ponta da raiz e cume dos brotos). Por exemplo, os promotores "SHOOTMERISTEMLESS" e "SCARECROW", que são ativos no desenvolvimento dos meristemas apicais dos brotos e das raízes podem ser utilizados (Di Laurenzio e outros, Cell 86: 423-433, 1996; Long, Nature 379: 66-69, 1996). Um outro exemplo de um promotor útil é aquele que controla a expressão do gene HMG2 da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, cuja expressão é restrita aos tecidos meristemáticos e florais (zona secretora do estigma, grãos maduros de pólen, tecido vascular do gineceu e óvulos fertilizados) (ver, por exemplo, Enjuto e outros, Plant Cell. 7: 517-527, 1995). Ainda um outro exemplo de um promotor útil é aquele que controla a expressão de genes relacionados com kn1 do milho e de outras espécies que exibem expressão específica ao meristema (ver, por exemplo, Granger e outros, Plant Mol. Biol. 31: 373-378, 1996; Kerstetter e outros, Plant Cell 6: 1877-1887, 1994; Hake e outros, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 350: 45-51, 1995). Um outro exemplo de um promotor meristemático é o promotor de KNAT1 de Arabidopsis thaliana. No cume dos brotos, o produto da transcrição de KNAT1 fica localizado primariamente no meristema apical dos brotos; a expressão de KNAT1 no meristema dos brotos diminui durante a transição floral e fica restrita ao córtex do caule de inflorescência (ver, por exemplo, Lincoln e outros, Plant Cell 6: 1859-1876, 1994).

[00058] Os promotores adequados específicos às sementes podem ser derivados dos genes a seguir: MAC1 do milho (Sheridan e outros, Genetics 142: 1009-1020, 1996; Cat3 do milho (GenBank No L05934, Abler e outros, Plant Mol. Biol. 22: 10131-1038, 1993); vivíparos-1 de Arabidopsis (Genbank No U93215); Atimycl de Arabidopsis (Urao e outros, Plant Mol. Biol. 32: 571-57, 1996; Conceição e outros, Plant 5: 493-505, 1994); napA de Brassica napus (GenBank No J02798); a

família do gene da napina de *Brassica napus* (Sjodahl e outros, *Planta* 197: 264-271, 1995) e outros (Chen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8560-8564, 1986).

[00059] O promotor específico aos óvulos para o gene BEL1 também pode ser utilizado (Reiser e outros, *Cell* 83: 735-742, 1995, GenBank No U39944; Ray e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5761-6765, 1994). Os promotores MEA (FIS1) e FIS2 específicos ao ovo e à célula central também são promotores úteis específicos ao tecido reprodutivo (Luo e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 10637-10642, 2000; Vielle-Calzada e outros, *Genes Dev.* 13: 2971-2982, 1999).

[00060] Um promotor específico ao pólen do milho foi identificado no milho (Guerrero e outros, *Mol. Gen. Genet.* 224: 161-168, 1990). Outros genes expressos especificamente no pólen foram descritos (ver, por exemplo, Wakeley e outros, *Plant Mol. Biol.* 37: 187-192, 1998; Ficker e outros, *Mol. Gen. Genet.* 257: 132-142, 1998; Kulikauskas e outros, *Plant Mol. Biol.* 34: 809-814, 1997; Treacy e outros, *Plant Mol. Biol.* 34: 603-611, 1997).

[00061] É reconhecido que promotores adicionais que podem ser utilizados são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos 5.378.619, 5.391.725, 5.428.147, 5.447.858, 5.608.144, 5.608.144, 5.614.399, 5.633.441, 5.633.435 e 4.633.436. É ainda reconhecido que os limites exatos de seqüências reguladoras podem não ser completamente definidos, os fragmentos de DNA de comprimentos diferentes podem ter atividade promotora idêntica.

[00062] A seqüência líder da tradução significa uma molécula de DNA localizada entre o promotor de um gene e a seqüência codificadora. A seqüência líder da tradução está presente no mRNA completamente processado a montante da seqüência de início da tradução. A seqüência líder da tradução pode afetar o processamento

do produto primário da transcrição em mRNA, a estabilidade do mRNA ou a eficiência de tradução. Os exemplos de seqüências líderes da tradução incluem os líderes de proteínas de choque térmico do milho e da petúnia, líderes de proteínas de revestimento de vírus vegetais, líderes do gene rubisco vegetal entre outros (Turner e Foster, Molecular Biotechnology 3: 225, 1995).

[00063] As "seqüências não-traduzidas a 3'" significam as seqüências de DNA localizadas a jusante de uma seqüência estrutural de polinucleotídeo e incluem seqüências que codificam a poliadenilação e outros sinais reguladores capazes de afetarem o processamento do mRNA ou a expressão gênica. O sinal de poliadenilação funciona em plantas causando a adição de nucleotídeos poliadenilados na extremidade a 3' do precursor do mRNA. A seqüência de poliadenilação pode ser derivada do gene natural, de uma variedade de genes vegetais ou do T-DNA. Um exemplo da seqüência de poliadenilação é a seqüência a 3' da nopalina sintase (nos 3'; Fraley e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-4807, 1983). O uso de seqüências diferentes não-traduzidas a 3' é exemplificado por Ingelbrecht e outros, Plant Cell 1: 671-680, 1989.

[00064] Os procedimentos de laboratório na tecnologia do DNA recombinante utilizada aqui são os bem conhecidos e comumente empregados na arte. As técnicas padronizadas são utilizadas para a clonagem, o isolamento do DNA e do RNA, a amplificação e a purificação. Geralmente, as reações enzimáticas que envolvem a DNA ligase, a DNA polimerase, as endonucleases de restrição e similares são realizadas de acordo com as especificações do fabricante. Estas técnicas e várias outras técnicas são geralmente realizadas de acordo com Sambrook e outros (1989).

[00065] O constructo de DNA da presente invenção pode ser introduzida no genoma de um hospedeiro vegetal desejado através de

uma variedade de técnicas de transformação convencionais que são bem conhecidas pelos versados na técnica. "Transformação" se refere a um processo de introdução de uma molécula de ácido polinucleico exógena (por exemplo, um constructo de DNA, uma molécula de ácido polinucleico recombinante) em uma célula ou protoplasto e que a molécula de ácido polinucleico exógena é incorporada em um genoma de célula hospedeira ou um genoma de organela (por exemplo, cloroplasto ou mitocôndria) ou é capaz de se replicar de forma autônoma. "Transformado(a)" ou "transgênico(a)" se refere a uma célula, um tecido, um órgão ou um organismo no qual um ácido polinucleico estranho, tal como um vetor de DNA ou uma molécula de ácido polinucleico recombinante foi inserida. Uma célula ou um organismo "transgênico" ou "transformado" também inclui a progênie da célula ou do organismo e a progênie produzida partindo de um programa de cruzamento que emprega tal planta "transgênica" como uma matriz em um cruzamento e que exibe um fenótipo alterado resultante da presença da molécula de ácido polinucleico estranha.

[00066] Os métodos de transformação de células ou de tecidos vegetais incluem, mas não estão limitados ao método de transformação mediado por *Agrobacterium* e ao método de transformação de Biolística ou mediado por pistola de partículas. Os vetores adequados de transformação vegetal para a finalidade de transformação mediada por *Agrobacterium* incluem os elementos derivados de um plasmídeo indutor de tumor (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens*, por exemplo, as regiões da borda direita (RB) e as regiões da borda esquerda (LB) e outros divulgados por Herrera-Estrella e outros, *Nature* 303: 209 (1983); Bevan, *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-8721 (1984); Klee e outros, *Bio-Technology* 3(7): 637-642 (1985). Em adição aos vetores de transformação vegetal derivados dos plasmídeos Ti ou indutores de raiz (Ri) de *Agrobacterium*, podem ser utilizados métodos alternativos para

inserir os constructos de DNA desta invenção nas células vegetais. Tais métodos podem envolver, mas não estão limitados, por exemplo, ao uso de lipossomos, de eletroporação, de reagentes químicos que aumentam a captação do DNA livre, a distribuição do DNA livre através do bombardeio de microprojéteis e a transformação utilizando vírus ou pólen.

[00067] Podem ser preparadas constructos de DNA que incorporam as seqüências codificadoras de variações da EPSPS de classe I da presente invenção para uso no direcionamento da expressão das seqüências diretamente do plastídeo da célula vegetal hospedeira. Os exemplos de tais constructos adequados para esta finalidade e de métodos que são conhecidos na arte são geralmente descritos, por exemplo, em Svab e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913-917 (1993) e na Patente U.S. No 5.693.507. É considerado que a transformação de plastídeos e a expressão das variações de EPSPS de classe I da presente invenção fornecerão tolerância ao glifosato para a célula vegetal.

[00068] Um vetor de expressão plasmideal adequado para a introdução de um ácido polinucleico que codifica um polipeptídeo da presente invenção em monocotiledôneas utilizando a eletroporação ou a transformação mediada por pistola de partículas é composto do seguinte: um promotor que é constitutivo ou específico ao tecido; um íntron que fornece um sítio de processamento para facilitar a expressão do gene, tal como o íntron da Hsp70 do milho (Patente U.S. No 5.593.874); e uma seqüência de poliadenilação a 3', tal como a seqüência a 3' da nopalina sintase (T-nos 3'; Fraley e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-4807, 1983). Este cassete de expressão pode ser montado em replicons com alto número de cópias adequados para a produção de grandes quantidades de DNA.

[00069] Quando números adequados de células contendo a

molécula de ácido polinucleico exógena que codifica os polipeptídeos da presente invenção são obtidos, as células podem ser cultivadas e então regeneradas em plantas inteiras. "Regeneração" se refere ao processo de cultivo de uma planta partindo de uma célula vegetal (por exemplo, protoplasto ou explante vegetal). Tais técnicas de regeneração se baseiam na manipulação de certos fitohormônios em um meio de crescimento para cultivo de tecidos, tipicamente se baseando em um marcador biocida e/ou herbicida que foi introduzido junto com as seqüências de nucleotídeos desejadas. A escolha da metodologia para a etapa de regeneração não é crítica, com protocolos adequados estando disponíveis para hospedeiros de Leguminosae (por exemplo, alfafa, soja, trevo), Umbelliferae (cenoura, aipo, pastinaca), Crusiferae (por exemplo, repolho, rabanete, canola/semente de colza), Curcubitaceae (por exemplo, melões e pepino), Gramineae (por exemplo, trigo, cevada, arroz, milho), Solanaceae (por exemplo, batata, tabaco, tomate, pimentas), várias plantas de cultivo florais, tal como o girassol e árvores que carregam castanhas, tais como amêndoas, cajú, avelãs e pecans. Ver, por exemplo, Ammirato e outros, Handbook of Plant Cell Culture – Crop Species. Macmillan Publ. Co. (1984); Shimamoto e outros, Nature 338: 274-276 (1989); Fromm, UCLA Symposium on Molecular Strategies for Crop Improvement, 16-22 de abril de 1990. Keystone, CO (1990); Vasil e outros, Bio/Technology 8: 429-434 (1990); Vasil e outros, Bio/Technology 10: 667-674 (1992); Hayashimoto, Plant Physiol. 93: 857-863 (1990); e Datta e outros, Bio-Technology 8: 736-740 (1990). Tais técnicas de regeneração são descritas de forma geral em Klee e outros, Ann. Rev. Plant Phys. 38: 467-486 (1987).

[00070] O desenvolvimento ou a regeneração de plantas transgênicas contendo a molécula de ácido polinucleico exógena que codifica um polipeptídeo de interesse é bem conhecida na técnica.

Preferencialmente, as plantas regeneradas são autopolinizadas para fornecer plantas transgênicas homozigotas, como discutido anteriormente. Por outro lado, o pólen obtido das plantas regeneradas é cruzado com plantas crescidas partindo de sementes de linhagens de importância agrícola. De forma inversa, o pólen de plantas destas linhagens importantes é utilizado para polinizar plantas regeneradas.

[00071] As plantas que podem ser produzidas para possuírem maior tolerância ao glifosato através da prática da presente invenção incluem, mas não estão limitadas à acácia, à alfafa, ao aneto, à maçã, ao damasco, à alcachofra, arugula, ao aspargo, ao abacate, à banana, à cevada, ao feijão, à beterraba, à amora-preta, ao vacínio, ao brócolis, à couve-de-bruxelas, ao repolho, à canola, ao cantalupo, à cenoura, à mandioca, ao couve-flor, ao aipo, à cereja, cilantro, à qualquer planta cítrica, às laranjas pequenas, ao café, ao milho, ao algodão, ao pepino, à conífera norte-americana, à berinjela, à endívia, à escarola, ao eucalipto, ao funcho, às figueiras, árvores florestais, às curcubitáceas, às uvas, ao grapefruit, ao melão, jicama, ao kiwi, à alface, ao alho-poró, ao limão, à lima, ao pinho de Loblolly, à manga, ao melão, ao cogumelo, à noz, à aveia, ao quiabo, à cebola, à laranja, a uma planta ornamental, à papaia, à salsa, à ervilha, ao pêssego, ao amendoim, à pêra, à pimenta, ao caqui, ao pinho, ao abacaxi, à banana-da-terra, à ameixa, à romã, ao choupo, à batata, à abóbora, ao marmelo, pinho radiado, radicchio, ao rabanete, à framboesa, ao arroz, ao centeio, ao sorgo, ao pinho do sul, à soja, ao espinafre, à abóbora, ao morango, à beterraba, à cana-de-açúcar, ao girassol, à batata doce, ao liquidâmbar, à tangerina, ao chá, ao tabaco, ao tomate, à turfa, a uma videira, à melancia, ao trigo, ao inhame e à abobrinha.

[00072] Os exemplos a seguir são fornecidos para elucidar melhor a prática da presente invenção e não devem ser interpretados de forma alguma como limitantes do âmbito da presente invenção. Os versados

na técnica reconhecerão que várias modificações, adições, substituições, truncamentos etc., podem ser feitos aos métodos e aos genes descritos aqui embora não saiam do espírito e do âmbito da presente invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Mutagênese direcionada ao sítio de uma EPSPS de classe I.

[00073] A mutagênese de uma molécula de DNA que codifica uma EPSPS de classe I foi direcionada em uma região da proteína definida pela seqüência polipeptídica –G-T-X1-X2-R-P- (SEQ ID No: 1) da EPSPS de classe I, em que X1 e X2 são qualquer aminoácido. A invenção descrita aqui fornece a mutagênese de um gene que codifica uma EPSPS de classe I, em que a mutagênese resulta em uma seqüência polipeptídica de –G-X4-X1-X2-R-X3- (SEQ ID No: 2) nesta região da proteína EPSPS de classe I relacionada à ligação do substrato da enzima e a molécula de glifosato. As substituições de aminoácidos na SEQ ID No: 1 que resultarão em uma EPSPS de classe I resistente ao glifosato incluem a substituição da treonina nativa (T) em X4 pelos aminoácidos isoleucina (I) ou leucina (L) e a substituição da prolina nativa (P) em X3 por treonina, glicina, cisteína, alanina ou isoleucina. As posições de aminoácidos 102 e 106 são denominadas de acordo com a seqüência polipeptídica da EPSPS do milho mostrada na Figura 1, entretanto, as seqüências codificadoras de EPSPS de classe I de outras plantas (Figura 2), por exemplo, da petúnia e da soja podem ser utilizadas como moldes para a mutagênese direcionada ao sítio uma vez que as posições relativas dos aminoácidos treonina e prolina, respectivamente, são conservadas; entretanto, um número de posição de aminoácido ligeiramente diferente na seqüência polipeptídica da EPSPS pode ocorrer por causa de variações no ponto de partida das EPSPSs maduras de várias origens (Patente U.S. No 5.866.775, Figura

1), tais variações são reconhecidas pelos versados na técnica e estão dentro do âmbito da presente invenção. De uma maneira similar, a mutagênese direcionada ao sítio das seqüências codificadoras de DNA das EPSPSs de classe I de procariotos, por exemplo, de *E. coli* (Figura 2) pode ser realizada utilizando iniciadores da mutagênese planejados para se hibridizarem a estas moléculas de DNA para criar as variações da EPSPS –G-X4-X1-X2-R-X3 (SEQ ID No: 2) como descrito aqui.

[00074] As mutações foram feitas utilizando o molde da seqüência codificadora do DNA da EPSPS vegetal como um exemplo de EPSPSs de classe I. As mutações da seqüência codificadora de DNA resultam em moléculas de proteínas variantes de EPSPSs através da substituição de códons (Tabela 1) que codificam aminoácidos na seqüência de DNA. As seqüências variantes de proteínas que possuem duas substituições de aminoácidos comparadas com a seqüência de proteína do tipo selvagem são referidas como variações duplas, uma única substituição de aminoácido é referida como uma variação simples. Todas as variações foram produzidas utilizando o PCR-based QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, No de Cat. 200518) seguindo as instruções do fabricante. A seqüência de DNA de cada iniciador de mutagênese foi planejada e então encomendada na Invitrogen Corp., Custom Primers (Carlsbad, CA). A mutagênese de uma molécula de DNA do tipo selvagem do milho (SEQ ID No: 3) que codifica a enzima EPSPS foi realizada utilizando pMON70461 (Figura 3) como o molde. O pMON70461 contém a seqüência codificadora da EPSPS do milho do tipo selvagem não-modificada. A T102I conhecida anteriormente, variação P106S (TIPS) foi criada através do método de mutagênese mediada pela PCR utilizando os pares de iniciadores, TIPSMut-1-U (SEQ ID Nº: 4) e TIPSMut-2-L (SEQ ID Nº: 5) como mostrado na Figura 4A e está contida no plasmídeo pMON70462. As variações simples da EPSPS foram

criadas através da mutagênese da sequência codificadora do DNA da EPSPS do tipo selvagem do milho como controles para medir a eficiência das variações duplas das EPSPSs. As variações simples da EPSPS a seguir foram criadas utilizando a mutagênese pela PCR: a variação T102I (iniciadores I1-U (SEQ ID Nº: 6) e I2-L (SEQ ID Nº: 7), pMON58455), a variação P106T (iniciadores mEmut-9-U (SEQ ID Nº: 8) e mEmut-10-L (SEQ ID Nº: 9), pMON70467, Figura 9), a variação P106S (iniciadores mEmut-7-U (SEQ ID Nº: 10) e mEmut-8-L (SEQ ID Nº: 11), pMON70466) e a variação P106L (iniciadores H1-U (SEQ ID Nº: 12) e H2-L (SEQ ID Nº: 13), pMON58451) foram criadas utilizando a sequência codificadora da EPSPS do milho do tipo selvagem não-modificada contida no pMON70461 como o molde para a mutagênese direcionada ao sítio.

[00075] As variações duplas da presente invenção foram feitas utilizando o pMON58452 (Figura 5) como o molde. Este molde do gene da EPSPS no pMON58452 contém a variação dupla da EPSPS do milho T102I, P106T (TIPT) que foi construída através da mutagênese do pMON70467 com os iniciadores de mutagênese mEmut-9-U e mEmut-10-L. As várias sequências iniciadoras de mutagênese foram planejadas e então foram sintetizadas pela Invitrogen Corp., Custom Primers e utilizadas em combinação em uma PCR para criar as sequências variantes codificadoras da EPSPS. A PCR foi ajustada em uma reação de 50 µL da maneira a seguir: 38 µL de dH₂O; 1 µL de dNTP a 2 mM; 5 µL de tampão 10X; 1 µL de pMON58452 (10 ng); 2 µL do iniciador U; 2 µL do iniciador L; 1 µL da enzima pfu Turbo. A PCR foi realizada em um ciclador térmico MJ Research PTC-200 utilizando o programa a seguir: Etapa 1 – 94°C durante 30 segundos; Etapa 2 – 94°C durante 30 segundos; Etapa 3 – 55°C durante 1 minuto; Etapa 4 – 68°C durante 14 minutos; Etapa 5 – voltar para a etapa 2, 16 vezes; Etapa 6 – Final. No final da PCR, 1 µL da enzima de restrição DpnI foi adicionado

a cada 50 µL de reação da PCR e a mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. O códon do aminoácido prolina (106) do pMON58452 foi substituído em etapas subseqüentes para fornecer variações adicionais que incluem TIPG (iniciador P106G-U, SEQ ID No: 14 e -L, SEQ ID No: 15), TIPA (iniciador P106A-U, SEQ ID No: 16 e -L, SEQ ID No: 17), TIPV (iniciador P106V-U, SEQ ID No: 18 e -L, SEQ ID No: 19), TIPL (iniciador P106L-U, SEQ ID No: 20 e -L, SEQ ID No: 21), TIPI (iniciador P106I-U, SEQ ID No: 22 e -L, SEQ ID No: 23), TIPM (iniciador P106M-U, SEQ ID No: 24 e -L, SEQ ID No: 25) e TIPC (iniciador P106C-U, SEQ ID No: 26 e -L, SEQ ID No: 27). As variações duplas do gene que codifica a proteína EPSPS foram geradas utilizando as condições de PCR descritas anteriormente.

[00076] No final da PCR, 1 µL da enzima de restrição DpnI foi adicionado a cada 50 µL de reação de PCR e a mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. A DpnI é uma enzima de restrição específica à metilação e à hemimetilação e clivará somente o plasmídeo de DNA de filamento duplo contendo pelo menos um filamento metilado do tipo selvagem, deixando o plasmídeo mutado intacto. Após o tratamento com a DpnI, 1 µL da mistura de reação tratada foi utilizada para transformar a cepa de *E. coli* competente XL1-blue (Stratagene Corp, La Jolla, CA) seguindo a instrução do fabricante. As células transformadas foram plaqueadas em uma placa de Petri contendo carbenicilina a uma concentração final de 0,1 mg/mL. A placa foi então incubada a 37°C durante a noite. Colônias isoladas foram escolhidas no dia seguinte e utilizadas para inocular uma cultura líquida de 3 mL contendo 0,1 mg/mL de carbenicilina. A cultura líquida foi incubada durante a noite a 37°C com agitação a 250 rpm. O DNA plasmideal foi preparado partindo de 1 mL da cultura líquida utilizando o Kit para miniprep da Qiagen (Qiagen Corp. No de Cat. 27160). O DNA foi eluído em 50 µL de dH₂O. A região codificadora inteira de três clones

independentes de cada mutagênese foi seqüenciada através da análise da seqüência (ABI Prism® 377, PE Biosystems, Foster City, CA e do software de análise de seqüência DNASTAR, DNASTAR Inc., Madison, WI) e confirmada como contendo a mutação desejada.

[00077] Outras seqüências codificadoras da EPSPS de classe I vegetal foram modificadas para conterem a variação TIPA. A seqüência codificadora da EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Columbia) EPSPS1 e as seqüências codificadoras da EPSPS da alface (*Lactuca sativa*) foram isoladas em relação à mutagênese. A RT-PCR foi utilizada para isolar a seqüência codificadora da proteína madura tanto da AtEPSPS1 quanto da EPSPS da alface. Todos os iniciadores foram encomendados da Invitrogen. Os tecidos foliares tanto de *Arabidopsis* quanto da alface foram moídos em pó em nitrogênio líquido com um almofariz e um pilão. O RNA total foi isolado utilizando o mini kit RNeasy da Qiagen (cat. Nº 74904) utilizando 10 mg de pó foliar e o RNA foi eluído em 50 µL de água. As reações da RT-PCR foram realizadas utilizando o kit para RT-PCR em uma etapa (Invitrogen Nº 10928-034) em uma reação de 50 µL contendo: 24 µL de dH₂O; 50 µL de tampão de reação; 20 µL de RNA total; 1 µL de iniciador AtEPSPS-F (SEQ ID No: 28) (10 µM); 1 µL de AtEPSPS-R (SEQ ID No: 29); 1 µL de Taq. A RT-PCR foi realizada em um ciclador térmico MJ Research PTC-200 utilizando o programa a seguir: Etapa 1 – 40°C durante 30 segundos; Etapa 2 – 94°C durante 2 minutos; Etapa 3 – 94°C durante 20 segundos; Etapa 4 – 65°C durante 30 segundos; Etapa 5 – 68°C durante 1 minuto e 30 segundos; Etapa 6 – voltar para a etapa 3, 30 vezes; Etapa 7 – Final. Ambas as reações da PCR forneceram uma banda de aproximadamente 1,3 quilobases em um gel para eletroforese de agarose a 1 por cento. A seqüência codificadora da EPSPS da alface foi isolada utilizando os iniciadores LsEPSPS-F (SEQ ID No: 30) e LsEPSPS-R (SEQ ID No: 31) no método descrito anteriormente. Os produtos da RT-PCR foram clonados no

vetor PCR-II (Invitrogen Corp.) e as moléculas de DNA foram seqüenciadas.

[00078] As variações TIPA da EPSPS de Arabidopsis e da alface foram geradas utilizando o PCR-based QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene No de Cat. 200518) e os iniciadores da mutagênese do DNA AtEPSPS-TIPA-F (SEQ ID No: 32) e AtEPSPS-TIPA-R (SEQ ID No: 33) para a mutação da seqüência codificadora da EPSPS de Arabidopsis e LsEPSPS-TIPA-F (SEQ ID No: 34) e LsEPSPS-TIPA-R (SEQ ID No: 35) para a mutação da seqüência codificadora da EPSPS da alface e as condições da PCR eram como as descritas anteriormente. Duas reações de mutagênese direcionada ao sítio adicionais foram realizadas para engenheirar um sítio de enzima de restrição, Nde1, na extremidade 5' e para remover um sítio Nde1 interno na seqüência codificadora da EPSPS da alface. Os fragmentos de DNA das variações TIPA da EPSPS de Arabidopsis e da alface foram então digeridos com Nde1 e Xho1 e clonados em um vetor pET19. As moléculas de DNA que codificam a EPSPS de Arabidopsis variante e a EPSPS da alface variante são mostradas na SEQ ID No: 36 e na SEQ ID No: 37, respectivamente, e as seqüências de aminoácidos codificadas para as variantes de EPSPS de Arabidopsis e variante de EPSPS de alface são mostradas em SEQ ID NO: 53 e SEQ ID NO: 54, respectivamente. Os exemplos de constructos de DNA com expressão em plantas e bactérias que foram produzidas com estas variações de seqüências codificadoras de EPSPS são ilustrados no pMON81548 (variação LsTIPA, promotor da Patente U.S. No 6.660.911) mostrado na Figura 11 e no pMON58491 (variante AtTIPA) mostrado na Figura 12. Qualquer uma das seqüências codificadoras das variações de EPSPS da presente invenção pode ser inserida em um cassete de expressão vegetal, por exemplo, o contido no pMON81519 ou no pMON81548 através da substituição da seqüência codificadora existente.

EXEMPLO 2

Purificação da EPSPS e análise enzimática

[00079] As seqüências codificadoras da EPSPS do tipo selvagem e variante foram clonadas em um vetor de base no pET-19b (Novagen, Madison, WI). As variações da EPSPS de classe I vegetal (milho) criada dessa forma receberam os números de plasmídeos pMON (Tabela 2). As proteínas variantes de EPSPS foram purificadas partindo do hospedeiro de *E. coli* utilizando os protocolos apresentados no manual do sistema pET, 9a edição (Novagen) ou através do método a seguir. Uma colônia isolada ou alguns microlitros de um estoque de glicerol foram inoculados em 4 mL de meio LB contendo 0,1 mg/mL de antibiótico carbenicilina. A cultura foi incubada a 37°C durante 4 horas. As culturas foram armazenadas a 4°C durante a noite. Na manhã seguinte, 1 mL da cultura feita durante a noite foi utilizado para inocular 100 mL de meio LB fresco contendo 0,1 mg/mL de carbenicilina. As culturas foram incubadas com agitação a 37°C durante 4-5 horas e então as culturas foram colocadas a 4°C durante 5-10 minutos. As culturas foram então induzidas com IPTG (concentração final de 1 mM) e incubadas com agitação a 30°C durante 4 horas ou a 20°C durante a noite. As células foram coletadas através da centrifugação a 7000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram congeladas a -70°C até o próximo uso. As proteínas foram extraídas através da ressuspensão da pelota de células no reagente BugBuster (Novagen) utilizando 5 mL de reagente por grama de células. A benzonase (125 Unidades) foi adicionada na ressuspensão e a suspensão de células foi então incubada em um misturador giratório durante 20 minutos à temperatura ambiente. Os restos celulares foram removidos através da centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi passado através de um filtro na extremidade de uma seringa de 0,45 µm e transferido para um tubo

novo. Uma coluna pré-embalada contendo 1,25 mL de resina His-Bind foi equilibrada com 10 mL de imidazol a 5 mM, NaCl a 0,5 M, Tris-HCl a 20 mM pH 7,9 (Tampão de Ligação 1X). A coluna foi então carregada com o extrato de células preparado. Após o extrato de células ter sido drenado, a coluna foi então lavada com 10 mL de Tampão de Ligação 1X, seguidos por 10 mL de imidazol a 60 mM, NaCl a 0,5 M, Tris-HCl a 20 mM pH 7,9 (Tampão de Lavagem 1X). Finalmente, a proteína sofreu diálise em Tris-HCl a 50 mM pH 6,8. A solução de proteínas resultante foi concentrada até ~ 0,1-0,4 mL utilizando o dispositivo de centrifugação Ultrafree (Biomax-10K MW cutoff, Millipore Corp, MA). As proteínas foram diluídas até 10 mg/mL e 1 mg/mL em Tris a 50 mM pH 6,8, glicerol a 30 por cento final e armazenadas a -20°C. A concentração das proteínas foi determinada utilizando o ensaio de proteínas da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, CA). A albumina do soro bovino foi utilizada para gerar uma curva padrão de 1-5 µg. As amostras (10 µL) foram adicionadas em poços em uma placa de 96 cavidades e misturadas com 200 µL do reagente de ensaio de proteínas da Bio-Rad (1 parte de concentrado de reagente de coloração:4 partes de água). As amostras foram lidas a uma OD595 após ~ 5 minutos utilizando uma leitora de placas spectraMAX 250 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) e comparadas com a curva padrão.

[00080] Os ensaios das enzimas EPSPS continham K⁺-HEPES a 50 mM pH 7,0 e shikimato-3-fosfato a 1 mM (mistura de Ensaio). O K_m-PEP foi determinado através da incubação da mistura de ensaio (30 µL) com a enzima (10 µL) e concentrações variáveis de [14C] PEP em um volume total de 50 µL. As reações foram resfriadas rapidamente após vários períodos com 50 µL de etanol a 90 por cento/ácido acético a 0,1 M pH 4,5 (solução de resfriamento rápido). As amostras foram centrifugadas a 14.000 revoluções por minuto e os sobrenadantes resultantes foram analisados em relação à produção de 14C-EPSP

através de HPLC. A conversão percentual de 14C-PEP para 14C-EPSP foi determinada através do ensaio radioativo por HPLC utilizando uma coluna de HPLC de troca aniônica fraca AX100 (4,6 x 250 mm, SynChropak) com o eluente de fosfato de potássio isocrático a 0,26 M, pH 6,5 a 1 mL/minuto misturado com o coquetel Ultima-Flo AP a 3 mL/min (Packard). As velocidades iniciais foram calculadas através da multiplicação da retroalimentação fracionada por unidade de tempo pela concentração inicial do substrato.

[00081] A constante de inibição (K_i) foi determinada através da incubação da mistura de ensaio (30 μ L) com e sem glifosato e ^{14} C-PEP (10 μ L de 2,6 mM). A reação foi iniciada através da adição da enzima (10 μ L). O ensaio foi resfriado rapidamente após 2 minutos com a solução de resfriamento rápido. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm e a conversão de 14C-PEP em 14C-EPSP foi determinada como mostrado anteriormente. O estado estacionário e os dados de IC50 foram analisados utilizando o software GraFit (Erithacus Software, Reino Unido). Os valores de K_i foram calculados partindo dos valores de IC50 utilizando o algoritmo a seguir: $K_i = [IC]_{50} / (1 + [S]/K_m)$. Os ensaios foram feitos de forma que a retroalimentação de 14C-PEP em 14C-EPSP era < 30 por cento. Nestes ensaios a albumina do soro bovino (BSA) e o fosfoenolpiruvato (PEP) foram obtidos da Sigma. O fosfoenol-[1- ^{14} C] piruvato (20 mCi/mmol) era da Amersham Corp. (Piscataway, NJ).

[00082] As variações da EPSPS do milho que foram clonadas no pET-19b e partindo das quais as proteínas foram expressas e analisadas, incluíam as variações duplas TIPS, TIPT, TIPG, TIPC, TIPA, TIPV, TIPM, TIPL e TIPI; e as variações simples T102I, P106S, P106T e P106L (Tabela 2). As enzimas foram purificadas e analisadas em relação ao K_m aparente do PEP (K_m -PEP) e a inibição pelo glifosato (K_i). A variação TIPS é bem conhecida e está atualmente no produto

para milho comercial Roundup Ready® GA21 (Patente U.S. No 6.040.497) e seus parâmetros cinéticos servem como um valor de linha de base para uma enzima EPSPS de classe I resistente ao glifosato que é suficiente para fornecer tolerância ao glifosato para uma planta transgênica. Todas as variações foram caracterizadas e os parâmetros cinéticos são mostrados na Tabela 2. Diferenças substanciais foram observadas entre estas variações. De forma surpreendente, os resultados mostraram que duas das novas variações, TIPA e TIPT, eram mais resistentes ao glifosato que a variação TIPS e demonstraram um Km-PEP similar. Estas variações duplas das enzimas EPSPSs fornecerão maior tolerância ao glifosato quando expressas apropriadamente em plantas transgênicas. A variação TIPG possui Km-PEP similar ao da enzima do tipo selvagem (WT), mas possui um K_i de apenas 38,6 μM , não uma melhoria em relação a TIPS, mas este K_i deveria ser suficiente para fornecer tolerância ao glifosato nas plantas transgênicas quando expressas apropriadamente. As variações TIPC e TIPI exibem um alto nível de resistência ao glifosato, mas possuem Km-PEP 1,7 vez e 2,2 vezes maior que o da enzima do tipo selvagem, respectivamente. Embora TIPC e TIPI sejam de alguma forma menos eficientes que a enzima do tipo selvagem em relação ao Km-PEP, exibem um alto nível de resistência ao glifosato e quando estas são superexpressas na forma de um transgene em células vegetais, estas enzimas deveriam ser suficientes para fornecer tolerância ao glifosato. Outras variações duplas que incluem TIPV, TIPM, TIPL exibiram uma resistência muito alta ao glifosato, mas possuem Km significativamente maior para PEP e, portanto, não possuem atividade de ligação ao substrato suficiente para fornecer uma atividade da enzima EPSPS útil para uma planta transgênica. Variações duplas adicionais TIPD e TIPN possuíam um Km para PEP de 355 e 566, respectivamente e não foram analisadas em relação ao K_i para o glifosato porque a atividade de

ligação ao substrato era muito ineficiente para que estas variações tivessem atividade de EPSPS eficiente. Com a finalidade de comparação, a cinética da enzima da EPSPS resistente ao glifosato de classe II que ocorre naturalmente isolada da cepa de *Agrobacterium* CP4 (EPSPS CP4) foi expressa partindo do pMON21104 (promotor RecA / líder G10 / EPSPS CP4 / terminador do T7) e analisada sob as mesmas condições que as EPSPSs variantes do milho e demonstrou um K_m -PEP de 14,4 μ M e um K_i para o glifosato de 5100 μ M.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos no estado estacionário de variantes de EPSPS do milho

Variante de EPSPS pMON	K_m -PEP (μ M)	K_i -glyph (μ M)
pMON70461 WT	27 $\pm$ 4	0,50 $\pm$ 0,06
PMON70462 TIPS	10,6 $\pm$ 1,6	58,0 $\pm$ 14
PMON58452 TIPT	11,2 $\pm$ 1,8	101,3 $\pm$ 12,7
PMON42480 TIPG	23,0 $\pm$ 3,7	38,6 $\pm$ 1,7
PMON42485 TIPC	47,0 $\pm$ 4,0	818,2 $\pm$ 74,4
PMON42481 TIPA	10,2 $\pm$ 1,1	148,3 $\pm$ 18,3
PMON42486 TIPI	60,3 $\pm$ 2,8	2500 $\pm$ 900
pMON42482 TIPV	109,3 $\pm$ 12,9	1600 $\pm$ 400
pMON42484 TIPM	143,3 $\pm$ 12,6	37200 $\pm$ 1500
pMON42483 TIPL	99,5 $\pm$ 8,9	2100 $\pm$ 100
pMON58455 T102I	233,0 $\pm$ 25,5	148,6 $\pm$ 12,4
pMON70466 P106S	17,1 $\pm$ 2,8	1,0 $\pm$ 0,1
pMON70467 P106T	24,6 $\pm$ 4,4	4,0 $\pm$ 0,6
pMON58451 P106L	86,7 $\pm$ 5,7	28,6 $\pm$ 0,1
pMON21104 CP4 EPSPS	14,4 $\pm$ 2,4	5100 $\pm$ 0,1

EXEMPLO 3

[00083] As variações duplas da EPSPS do milho ZmTIPT (SEQ ID

No: 38) e ZmTIPA (SEQ ID No: 39) foram produzidas com uma fusão de tradução CTP nos constructos de DNA de expressão vegetal, pMON70472 (Figura 7) e pMON70475 (Figura 8), respectivamente. A sequência de aminoácidos codificada da variante dupla de EPSPS de milho ZmTIPT é mostrada em SEQ ID NO: 55, e a sequência de aminoácidos codificada da variante dupla de EPSPS de milho ZmTIPA é mostrada em SEQ ID NO: 56. O pMON30167 (Figura 6) foi digerido com SphI/NotI e EcoRI, um fragmento de DNA estrutural de NotI/EcoRI do pMON30167 e um fragmento de DNA de SphI/NotI (promotor da actina do arroz, P-OsAct1 e íntron, I-Os.Act1, Patente U.S. No 5.641.876) foram purificados em gel. Uma molécula de DNA de EPSPS-TIPT do milho foi isolada do pMON58452 através da incorporação dos sítios das endonucleases SphI e EcoRI nas extremidades com as moléculas iniciadoras de DNA ZmAroA-1 (SEQ ID No: 40) e ZmAroA-2 (SEQ ID No: 41). O fragmento de DNA de mEPSPS-TIPT amplificado foi digerido com SphI e EcoRI e purificado em gel. Uma ligação tripla foi realizada com os dois fragmentos de pMON30167 e o fragmento de DNA de EPSPS-TIPT de milho modificado. O plasmídeo ligado foi transformado na cepa de E. coli XL1-blue seguindo a instrução do fabricante e selecionado em relação a colônias com o plasmídeo correto. O N terminal maduro da EPSPS do milho foi restaurado (deve ser Ala e não Met) através da mutagênese com o kit Stratagene QuikChange de acordo com a instrução do fabricante e utilizando moléculas de iniciadores de DNA ZmAroA-3 (SEQ ID No: 42) e ZmAroA-4 (SEQ ID No: 43) contidos no pMON70472 (Figura 7).

EXEMPLO 4

[00084] Um constructo de DNA contendo a variação TIPT (pMON70472, Figura 7) sob o controle do promotor da actina do arroz foi transformada em células vegetais de milho (LH198 x Hill) através de um método de transformação mediado por *Agrobacterium*. Por exemplo,

é utilizada uma cepa de *Agrobacterium* desarmada C58 carregando o constructo de DNA binário da presente invenção. O constructo de DNA é transferida para o *Agrobacterium* através de um método de cruzamento triparental (Ditta e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 7347-7351, 1980). Culturas líquidas de *Agrobacterium* são iniciadas partindo dos estoques em glicerol ou de uma placa recém-estriada e cultivadas durante a noite a 26°C – 28°C com agitação (aproximadamente 150 rpm) até a fase de crescimento de mid-log em meio LB líquido, pH 7,0 contendo os antibióticos apropriados. As células de *Agrobacterium* são ressuspensas no meio de inoculação (CM4C líquido) e a densidade é ajustada a uma DO₆₆₀ de 1. Embriões de milho HillxLH198 e Hill imaturos do Tipo II recém-isolados são inoculados com *Agrobacterium* contendo um constructo e co-cultivados vários dias na escuridão a 23°C. Os embriões são então transferidos para o meio de retardo e incubados a 28°C durante vários ou mais dias. Todas as culturas subsequentes são mantidas nesta temperatura. Os embriões são transferidos para um primeiro meio de seleção contendo carbenicilina 500/0,5 mM de glifosato. Duas semanas mais tarde, o tecido sobrevivente é transferido para um segundo meio de seleção contendo carbenicilina 500/1,0 mM de glifosato. Subcultura do calo sobrevivente a cada 2 semanas até que os eventos pudessem ser identificados. Isto pode levar aproximadamente 3 subculturas em glifosato a 1,0 mM. Uma vez que os eventos são identificados, expandir o tecido para regenerar. As plantículas (eventos) são transferidas para o meio MSOD em recipiente de cultura e mantidas durante duas semanas. A eficiência de transformação é determinada através da divisão do número de eventos produzidos pelo número de embriões inoculados. Então as plantas com as raízes são transferidas para o solo. Os versados na técnica de métodos de transformação de monocotiledôneas podem modificar este método para fornecer plantas monocotiledôneas transgênicas

substancialmente idênticas contendo as composições de DNA da presente invenção ou utilizar outros métodos, tal como, a pistola de partículas, que são conhecidos por fornecerem plantas monocotiledôneas transgênicas.

[00085] Os resultados da análise molecular e a seleção com o glifosato dos eventos de milho regenerados transformados com um constructo de DNA contendo ZmTIPT são mostrados na Tabela 3. Os eventos foram analisados em relação à inserção de uma cópia única no genoma do milho e em relação à fertilidade vegetativa e do sexo masculino. Oito de treze eventos transgênicos (61%) contendo o cassete de expressão vegetal pMON70472 (TIPT) foram avaliados utilizando a análise com Taqman® (ABI, Foster City, CA) e determinados como sendo um inserto de cópia única no genoma do milho. Os eventos foram tratados com uma aplicação foliar de 22,42 gramas/acre (32 onças/acre) de Roundup® no estágio V4 do desenvolvimento do milho e então uma outra aplicação foliar de 44,84 gramas/acre (64 onças/acre) de Roundup® Ultra em aproximadamente V7. As plantas tratadas foram avaliadas em relação à tolerância vegetativa (glyphT) e reprodutiva (fértil) ao glifosato. Quatro dos oito eventos de cópia única (50%) não exibiram danos vegetativos causados pela aplicação do glifosato em V4 (%V4 glyphT). Um tratamento de 1814,37 gramas (64 onças) de Roundup® Ultra foi aplicado aproximadamente no estágio V7 e as plantas foram avaliadas em relação à tolerância vegetativa ao glifosato e a fertilidade do sexo masculino (%V7glyphT/fértil). Todos os quatro eventos 100% (4/4) que tinham cópia única e eram tolerantes de forma vegetativa ao glifosato em V4 eram também tolerantes de forma vegetativa e tinham o sexo masculino totalmente fértil após o tratamento em V7. Comparada com a EPSPS resistente ao glifosato padronizada comercial (CP4 EPSPS) a variação ZmTIPT teve um desempenho surpreendentemente bom. As

constructos de DNA contendo a variação TIPT de uma EPSPS de classe I fornecem plantas que são tolerantes de forma vegetativa e reprodutiva a um herbicida que contém glifosato.

Tabela 3. Resultados do tratamento de tolerância ao glifosato de eventos do milho contendo a variação TIPT EPSPS.

Constructo de DNA	Nº de eventos	Cópia única	% V4 glypT	%V7glypT/fertile
pMON70472 (ZmTIPT)	13	61% (8/13)	50% (4/8)	100% (4/4)
pMON30167 (CP4 EPSPS)	24	33% (8/24)	62% (5/8)	100% (5/5)

EXEMPLO 5

[00086] A variação ZmTIPT foi construída em um constructo de expressão vegetal adequada para a expressão de plantas dicotiledôneas. O constructo de DNA foi denominada de pMON81519 e é ilustrada na Figura 10. O constructo de DNA e os constructos de controle foram transferidos para *Agrobacterium* através de um método de cruzamento triparental como descrito anteriormente. As células de *Agrobacterium* transformadas foram utilizadas para transferir o cassete de expressão vegetal para células de *Arabidopsis* e de tabaco.

[00087] Os embriões de *Arabidopsis* foram transformados através de um método mediado por *Agrobacterium* essencialmente como descrito por Bechtold N e outros, CR Acad Sci Paris Sciences di la vie/life sciences 316: 1194-1199, (1993). Uma cepa de *Agrobacterium* ABI contendo um constructo de DNA é preparado como o inóculo através do crescimento em um tubo de cultura contendo 10 mL de Luria Broth e antibióticos. O inóculo de *Agrobacterium* é peletizado através de centrifugação e ressuspenso em 25 mL de Infiltration Medium (Sais Basais de MS a 0,5%, Vitaminas B-5 de Gamborg a 1%, Sacarose a 5%, MES a 0,5 g/L, pH 5,7) com 0,44 nM de benzilaminopurina (10 µL de um estoque a 1,0 mg/L em DMSO por litro) e 0,02% de Silwet L-77 a uma DO₆₀₀ de 0,6.

[00088] As plantas de *Arabidopsis* maduras em fluorescência são infiltradas a vácuo em uma câmara de vácuo com o inóculo de *Agrobacterium* através da inversão dos vasos contendo as plantas no inóculo. A câmara é selada, é aplicado um vácuo durante vários minutos, o vácuo é liberado repentinamente, os vasos são "carimbados em papel" para remover o excesso de inóculo, os vasos são cobertos com cúpulas de plástico e os vasos são colocados em uma câmara de crescimento a 21°C com 16 horas de luz e 70% de umidade. Aproximadamente 2 semanas após a infiltração a vácuo do inóculo, cada planta foi coberta com um saco de polinização Lawson 511. Aproximadamente 4 semanas após a infiltração, a água das plantas é retida para permitir que seque. Colheita das sementes aproximadamente 2 semanas após a secagem.

[00089] As plantas de *Arabidopsis* transgênicas produzidas através da infiltração de embriões de sementes são selecionadas de plantas não transgênicas através de um método de seleção por germinação. As sementes colhidas têm sua superfície esterilizada e então são espalhadas sobre a superfície de placas com meio de seleção contendo Sais Basais de MS a 4,3 g/L, B-5 de Gamborg (500 X) a 2,0 g/L, MES a 0,5 g/L e Phytagar a 8 g/L com Carbenicilina a 250 mg/L, Cefotaxima a 100 mg/L e PPM a 2 mL/L e 300 µM de glifosato adicionados na forma de uma solução líquida esterilizada por filtração, após a autoclavagem. As plantas de *Arabidopsis* transgênicas tolerantes ao glifosato dos eventos V1 de pMON81519 e do constructo pMON81517 de controle são selecionadas através da aplicação com spray do herbicida glifosato a uma taxa de 16,81 gramas/are (24 onças/acre), as plantas sobreviventes são transplantadas para vasos individuais. As plantas em V1 são borrifadas uma segunda vez correspondendo à observação de murchamento, aproximadamente 16 dias após a uma taxa de 16,81 gramas/acre (24 onças/acre). A segunda borrifação determinará a

eficiência dos dois constructos para conferir tolerância reprodutiva. As plantas são observadas em relação aos efeitos vegetativos e reprodutivos da aplicação do glifosato. Sessenta e duas plantas foram avaliadas se tinham sido transformadas com o constructo de controle pMON81517 que contém a seqüência codificadora de CP4 EPSPS (EPSPS de classe II), quarenta e nove plantas foram avaliadas se tinham sido transformadas com o pMON81519. Os resultados mostrados na Tabela 4 demonstram que a porcentagem de plantas exibindo tolerância e fertilidade no glifosato é aproximadamente a mesma para a variação de EPSPS de classe I ZmTIPT assim como para a EPSPS de classe II.

[00090] O tabaco é uma planta modelo bem conhecida para testar constructos transgênicos e os métodos de transformação são bem conhecidos na técnica da transformação vegetal. Sucintamente, o tecido foliar do tabaco é cortado e colocado sobre placas sólidas de pré-cultura contendo o meio de cultura apropriado. No dia anterior à inoculação com *Agrobacterium*, uma alça de 10 µL de uma cultura de *Agrobacterium* transformada contendo o pMON81519 ou o constructo de controle é colocada em um tubo contendo 10 mL de meio YEP com antibióticos apropriados para manter a seleção do constructo de DNA. O tubo é colocado em um agitador para crescer durante a noite a 28°C. A OD₆₀₀ do *Agrobacterium* é ajustada em uma OD₆₀₀ de 0,15 – 0,30 com meio TXD. Inocular os explantes do tecido foliar do tabaco através da pipetagem de 7 – 8 mL da suspensão líquida de *Agrobacterium* diretamente sobre as placas de pré-cultura cobrindo o tecido do explante. Permitir que o *Agrobacterium* permaneça na placa durante 15 minutos. Inclinar as placas e aspirar o líquido utilizando uma pipeta com orifício amplo de 10 mL esterilizada. Os explantes são co-cultivados nestas mesmas placas durante 2 – 3 dias. Os explantes são então transferidos para meio fresco contendo os agentes de seleção

apropriados e mantidos durante 3 – 4 semanas em cujo tempo o tecido do calo é transferido para meio fresco. Em 6 – 8 semanas, os brotos devem ser cortados do calo permitido enraizar no meio de cultura. Os brotos enraizados são então transferidos para o solo após 2 – 3 semanas. As plantas são tratadas com 11,21 – 16,81 gramas/acre (16 - 24 onças/acre) de glifosato e avaliadas em relação à tolerância vegetativa e reprodutiva. Os resultados mostrados na Tabela 4 demonstram que a porcentagem de plantas exibindo tolerância e fertilidade no glifosato é aproximadamente a mesma para a variação EPSPS de classe I ZmTIPT assim como para a EPSPS de classe II.

Tabela 4. Resultados do tratamento de tolerância ao glifosato de eventos de *Arabidopsis* e do tabaco contendo a variação EPSPS TIPT.

Construto de DNA	Tabaco % glypT/fértil	Arabidopsis % glypT/Fértil
PMON81517	56% (N=41)	61% (N=62)
(CP4 EPSPS)	49% (N=39)	65% (N=49)

EXEMPLO 6

[00091] As EPSPSs de classe I podem ser modificadas através de métodos de mutagênese direcionada ao sítio ou do método de mutagênese aleatória para fornecer uma enzima que é resistente ao glifosato. A presente invenção fornece preferencialmente substituições de aminoácidos das posições Thr102 e Pro106. Em adição às variações TIP-T,G,C,A e I da presente invenção descritas anteriormente, foi realizada uma substituição adicional do códon Thr102 que foi substituído por um códon de leucina (L, Leu) e o códon Pro106 foi substituído por um códon de alanina (A, Ala) através da modificação direcionada ao sítio dos códons correspondentes em uma sequência codificadora do DNA da EPSPS do milho resultando em uma variação ZmTLPA (SEQ ID Nº: 44) que fornece uma enzima resistente ao glifosato. Em uma outra variação, o códon Thr102 foi substituído por um

códon para a Glutamina (Q, Gln), o códon Pro106 modificado para um códon de Ala, resultando em uma variação TQPA.

[00092] Estas variações da EPSPS do milho, TLPA e TQPA foram geradas utilizando o PCR-based QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit da Stratagene (Nº de Cat. 200518). A seqüência codificadora da EPSPS do milho não-modificada foi utilizada como o molde para a PCR para gerar as variações. Os iniciadores de óligo para a mutagênese foram encomendados da Invitrogen. A PCR foi ajustada em uma reação de 50 µL da maneira a seguir: 38 µL de dH₂O, 1 µL de dNTP a 2 mM; 5 µL do tampão 10X; 1 µL do pMON70461 (10 ng); 2 µL de ZmTLPA-1 (SEQ ID Nº: 45); 2 µL de ZmTLPA-2 (SEQ ID Nº: 46); 1 µL da enzima pfu Turbo. A PCR foi realizada em um ciclador térmico MJ Research PTC-200 utilizando o programa a seguir: Etapa 1 – 94°C durante 2'; Etapa 2 – 94°C durante 30"; Etapa 3 – 55°C durante 30"; Etapa 4 – 68°C durante 14'; Etapa 5 – voltar para a etapa 2, 16 vezes; Etapa 6 – Final. No final da PCR, 1 µL da enzima de restrição DpnI foi adicionado a cada 50 µL da reação da PCR e a mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após o tratamento com a DpnI, 1 µL da mistura de reação tratada foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* competente XL1-blue (Stratagene) seguindo a instrução do fabricante. As células transformadas foram plaqueadas em uma placa de Petri contendo carbenicilina a uma concentração final de 0,1 mg/mL. A placa foi então incubada a 37°C durante a noite. As colônias isoladas foram escolhidas no dia seguinte e utilizadas para inocular uma cultura líquida de 3 mL contendo 0,1 mg/mL de carbenicilina. A cultura líquida foi incubada durante a noite a 37°C com agitação a 250 rpm. O DNA plasmideal foi preparado partindo de 1 mL da cultura líquida utilizando o Kit de miniprep da Qiagen (Nº de Cat. 27160). O DNA foi eluído em 50 µL de dH₂O. A região codificadora inteira de três clones independentes de cada mutagênese foi seqüenciada e confirmada como contendo a

mutação desejada. As seqüências codificadoras variantes foram inseridas em um vetor de expressão pET19 na orientação apropriada para fornecer a expressão da enzima variante na forma de uma fusão de tradução com uma marcação para purificação.

[00093] As enzimas EPSPSs mutantes do milho (TLPA e TQPA) foram analisadas em relação à atividade catalítica, à ligação ao substrato e à resistência ao glifosato (K_i) utilizando as condições de ensaio descritas anteriormente. Os resultados são mostrados na Tabela 5. Estes mutantes foram comparados com a EPSPS do milho não-modificada do tipo selvagem (WT) e a variação TIPA. Os resultados fornecem evidência de que a variação TLPA é resistente ao glifosato e possui cinética enzimática suficiente que quando expressa em uma planta transgênica fornecerá tolerância ao glifosato para a planta transgênica quando fundida com um CTP ou modificada para a expressão no cloroplasto. Espera-se que as substituições adicionais de aminoácidos na posição 106 que incluem a treonina, a glicina, a cisteína e a isoleucina resultem em uma enzima resistente ao glifosato como observado em combinação com a modificação T-I na posição 102.

Tabela 5. Cinética do estado estacionário da EPSPS

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_m -PEP (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	K_i (μM)
Milho do tipo selvagem	$8,8 \pm 0,5$	27 ± 4	0,3	$0,5 \pm 0,06$
TIPA	$2,1 \pm 0,1$	$10,2 \pm 1,1$	0,2	$148,3 \pm 18,3$
TLPA	$2,4 \pm 0,1$	$13,1 \pm 2,5$	0,2	$46,8 \pm 7,6$
TQPA	$3,8 \pm 0,2$	$163,8 \pm 22,9$	0,02	2200 ± 200

[00094] Tendo ilustrado e descrito os princípios da presente invenção, deve ser evidente para os versados na técnica que a invenção pode ser modificada em arranjo e detalhe sem sair de tais princípios. São reivindicadas todas as modificações que estão dentro do espírito e

do âmbito das reivindicações em anexo.

[00095] Todas as publicações e os documentos de patentes publicados citados neste relatório descritivo são incorporados aqui como referência até a mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como sendo incorporado como referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de DNA isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°: 36, SEQ ID N°: 37, SEQ ID N°: 38 e SEQ ID N°: 39.

2. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula de DNA selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 36, da SEQ ID N°: 37, da SEQ ID N°: 38 e da SEQ ID N°: 39.

3. Processo de preparação de uma planta tolerante ao glifosato, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de: 1) contato de uma célula vegetal receptora com o constructo de DNA como definido na reivindicação 2, em que o dito constructo de DNA é incorporada no genoma da célula vegetal receptora; e 2) regeneração da célula vegetal receptora em uma planta; e 3) aplicação de uma dose eficiente de glifosato na planta, em que a planta exibe um fenótipo de tolerância ao glifosato.

4. Processo de controle de ervas-daninhas em um campo de plantas de cultivo tolerantes ao glifosato, caracterizado pelo fato de que compreende a aplicação no dito campo de planta de cultivo tolerante ao glifosato de uma dose eficiente de um herbicida que contém glifosato, em que a dita planta de cultivo tolerante ao glifosato contém uma construção de DNA que compreende um promotor que funciona em células vegetais ligado de forma operacional a uma molécula de DNA selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 36, SEQ ID N°: 37, SEQ ID N°: 38 e SEQ ID N°: 39.

5. Enzima EPSPS purificada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 53, SEQ ID N°: 54, SEQ ID N°: 55 e SEQ ID N°: 56.

GCGGGTGCCGAAGAAATCGTGCTGCAGCCGATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCCACGGCTTCTTTAGCACGACGTCGGCTAGTTCTCTAGAGGCCGTGGCAGTTTCGAC
A G A E E I V L Q P I K E I S G T V K L
CCGGGGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTACTCGCCGCCCTGTCCGAGGGGACA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCCCAGGTTTCAGCGAAAGGTTGGCCTAGGAGGATGAGCGGCGGGACAGGCTCCCTGT
P G S K S L S N R I L L L A A L S E G T
ACAGTGGTTGATAACCTGCTGAACAGTGAGGATGTCCACTACATGCTCGGGGCCTTGAGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTCACCAACTATTGGACGACTTGTCACTCCTACAGGTGATGTACGAGCCCCGGAACCTCC
T V V D N L L N S E D V H Y M L G A L R
ACTCTTGGTCTCTCTGTGCGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCTGTAGTTGTTGGCTGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGAGAACCAGAGAGACAGCTTCGCCTGTTTCGACGGTTTCTCGACATCAACAACCGACA
T L G L S V E A D K A A K R A V V V G C
GGTGGAAAGTTCCCAGTTGAGGATGCTAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCACCTTTCAAGGGTCAACTCCTACGATTTCTCCTTCACGTCGAGAAGAACCCTTACGA
G G K F P V E D A K E E V Q L F L G N A
GGAAGTGAATGCGGCCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTTGACGTTACGCCGGTAACTGTCGTCGACAATGACGACGACCACCTTTACGTTGAATG
G T A M R P L T A A V T A A G G N A T Y
GTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCCATTGGCGACTTGGTTGTGCGATTG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGAAGTACCTCATGGTTCTTACTCCCTCTCTGGGTAAACCGCTGAACCAACAGCCTAAC
V L D G V P R M R E R P I G D L V V G L
AAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTGTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCGTGGAACACGCTCTACAACTAACAAAGGAACCGTGACTGACGGGTGGACAAGCACAG
K Q L G A D V D C F L G T D C P P V R V
AATGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTCAAGCTGTCTGGCTCCATCAGCAGTCAG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTACCTTAGCCTCCCGATGGACCACCGTTCCAGTTCGACAGACCGAGGTAGTCGTCAGTC
N G I G G L P G G K V K L S G S I S S Q
TACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGAACTCACGGAACGACTACCGACGAGGAAACCGAGAACCCTACACCTCTAACTTTAG

FIG 1a

Y L S A L L M A A P L A L G D V E I E I
ATTGATAAATTAATCTCCATTCCGTACGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACTATTTAATTAGAGGTAAGGCATGCAGCTTTACTGTAACCTAACTACCTCGCAAAA
I D K L I S I P Y V E M T L R L M E R F
GGTGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAA
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCACACTTTCGTCTCGTAAGACTATCGACCCTGTCTAAGATGTAATCCCTCCAGTTTTT
G V K A E H S D S W D R F Y I K G G Q K
TACAAGTCCCCTAAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTTTCAGGGGATTTTTACGGATACAACCTCCACTACGGAGTTTCGCGTTTCGATAAAGAAC
Y K S P K N A Y V E G D A S S A S Y F L
GCTGGTGCTGCAATTACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAAGGTTGTGGCACCACCAGTTTG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACCACGACGTTAATGACCTCCCTGACACTGACACCTTCCAACACCGTGGTGGTCAAAC
A G A A I T G G T V T V E G C G T T S L
CAGGGTGATGTGAAGTTTGCTGAGGTACTGGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGGACC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCCACTACACTTCAAACGACTCCATGACCTCTACTACCCTCGCTTCCAATGTACCTGG
Q G D V K F A E V L E M M G A K V T W T
GAGACTAGCGTAACTGTTACTGGCCCCACCGCGGAGCCATTTGGGAGGAAACACCTCAAG
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTGATCGCATTGACAATGACCGGTGGCGCCCTCGGTAAACCCTCCTTTGTGGAGTTC
E T S V T V T G P P R E P F G R K H L K
GCGATTGATGTCAACATGAACAAGATGCCTGATGTGCCATGACTCTTGCTGTGGTTGCC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCTAACTACAGTTGTACTTGTCTACGGACTACAGCGGTACTGAGAACGACACCAACGG
A I D V N M N K M P D V A M T L A V V A
CTCTTTGCCGATGGCCCGACAGCCATCAGAGACGTGGCTTCCTGGAGAGTAAAGGAGACC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGAAACGGCTACCGGGCTGTCCGTAGTCTCTGCACCGAAGGACCTCTCATTTCTCTGG
L F A D G P T A I R D V A S W R V K E T
GAGAGGATGGTTGCGATCCGGACGGAGCTAACCAAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGAAGGG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTCCTACCAACGCTAGGCCTGCCTCGATTGGTTTCGACCCTCGTAGACAACCTCCTTCCC
E R M V A I R T E L T K L G A S V E E G

FIG 1b

CCGGACTACTGCATCATCACGCCGCCGGAGAAGCTGAACGTGACGGCGATCGACACGTAC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCTGATGACGTAGTAGTGCGGCGGCCTCTTCGACTTGCACTGCCGCTAGCTGTGCATG

P D Y C I I T P P E K L N V T A I D T Y

GACGACCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCCCTTGCCGCCTGTGCCGAGGTCCCCGTCACC
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGCTGGTGTCTTACCGGTACCGGAAGAGGGAACGGCGGACACGGCTCCAGGGGCAGTGG

D D H R M A M A F S L A A C A E V P V T

ATCCGGGACCCTGGGTGCACCCGGAAGACCTTCCCCGACTACTTCGATGTGCTGAGCACT
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGGCCCTGGGACCCACGTGGGCCTTCTGGAAGGGGCTGATGAAGCTACACGACTCGTGA

I R D P G C T R K T F P D Y F D V L S T

TTCGTCAAGAATTAA
1321 -----+----- 1335
AAGCAGTTCTTAATT

F V K N *

FIG 1c

```

1
petunia   ATAQKPS... EIVLQPIKEI SGTVKLP GSK SLSNRILLLA ALSEGTTVVD
soybean   AAAEKPSTAP EIVLEPIKDI SGTITLPGSK SLSNRILLLA ALSEGTTVVD
maize     ~~~~~AGAE EIVLQPIKEI SGTVKLP GSK SLSNRILLLA ALSEGTTVVD
E.coli    ~~~~~ME SLTLQPIARV DGTINLP GSK SVSNRALLLA ALAHGKTVLT

51
petunia   NLLSSDDIHY MLGALKTLGL HVEEDSANQR AVVEGCGGLF PVGKESKEEI
soybean   NLLYSEDIHY MLGALRTLGL RVEDDKTTKQ AIVEGCGGLF PTIKESKDEI
maize     NLLNSEDVHY MLGALRTLGL SVEADKAAKR AVVVGCGGKF PV.EDAKEEV
E.coli    NLLDSDVRH MLNALTALGV SYTL SADRTR CEIIGNGG.. PLHAEG..AL

101
petunia   QLFLGNAGTA MRPLTAAVTV AGGNSRYVLD GVPRMRERPI SDLVDGLKQL
soybean   NLFLGNAGTA MRPLTAAVVA AGGNASYVLD GVPRMRERPI GDLVAGLKQL
maize     QLFLGNAGTA MRPLTAAVTA AGGNATYVLD GVPRMRERPI GDLVVGLKQL
E.coli    ELFLGNAGTA MRPLAALCL ..GSNDIVLT GEPRMKERPI GHLVDALRLG

151
petunia   GAEVDCFLGT KCPPVRIVSK GGLPGGKVKL SGSISSQYLT ALLMAAPLAL
soybean   GADVDCFLGT NCPPVRVNGK GGLPGGKVKL SGSVSSQYLT ALLMAAPLAL
maize     GADVDCFLGT DCPVVRVNGI GGLPGGKVKL SGSISSQYLS ALLMAAPLAL
E.coli    GAKITYLEQE NYPLRL..Q GGFTGGNVDV DGSVSSQFLT ALLMTAPLAP

201
petunia   GDVEIEIIDK LISVPYVEMT LKLMERFG.. ISVEHSSSWD RFFVRGGQKY
soybean   GDVEIEIVDK LISVPYVEMT LKLMERFG.. VSVEHSGNWD RFLVHGGQKY
maize     GDVEIEIIDK LISIPYVEMT LRLMERFG.. VKAEHSDSWD RFYIKGGQKY
E.coli    EDTVIRIKGD LVSKPYIDIT LNLMKTFG.. VEIENQ.HYQ QFVVKGGQSY

251
petunia   KSPGKAFVEG DASSASY.FL AGAAVTGGTI TVEGCGTNSL QGDVKFAEVL
soybean   KSPGNAFVEG DASSASY.LL AGAAITGGTI TVNGCGTSSL QGDVKFAEVL
maize     KSPKNAYVEG DASSASY.FL AGAAITGGTV TVEGCGTSSL QGDVKFAEVL
E.coli    QSPGTYLVEG DASSASY.FL AAAAIKGGTV KVTGIGRNSM QGDIRFADVL
cp4       LTGQVIDVPG DPSSTAFLV AALLVPGSDV TILNVL MNPT RTGLIL..TL

301
petunia   EKMGA EVTWT ENSVTVKGPP RSSSGRKH.L RAIDVNMNMK P...DVAMTL
soybean   EKMGA KVTS ENSVTVSGPP RDFSGRKV.L RGIDVNMNMK P...DVAMTL
maize     EMMGAKVTWT ETSVTVTGPP REPFG RKH.L KAIDVNMNMK P...DVAMTL
E.coli    EKMGA TICWG DDYISCT... ..RGE.L NAIDMDMNI P...DAAMTI
cp4       QEMGADIEVI NPRLAGGEDV ADLRVRSSTL KGVTV PEDRA PSMIDEYPIL

351
petunia   AVVALYADGP TAIRDVASWR VKETERMIAI CTELRLKLGAT VEEGPDYCII
soybean   AVVALFANGP TAIRDVASWR VKETERMIAI CTELRLKLGAT VEEGPDYCVI
maize     AVVALFADGP TAIRDVASWR VKETERMVAI RTELTKLGAS VEEGPDYCII
E.coli    ATAALFAKGT TTLRNIYNWR VKETDRLFAM ATELKVGAE VEEGHDYIRI

401
petunia   ..TPPEK... .LNVTDIDTY DDHRMAMAFS LAAC.ADPV TINDPGCTRK
soybean   ..TPPEK... .LNVTAIDTY DDHRMAMAFS LAAC.GDPV TIKDPGCTRK
maize     ..TPPEK... .LNVTAIDTY DDHRMAMAFS LAAC.AEVP TIRDPGCTRK
E.coli    ..TPPEK... .LNFAEIATY NDHRMAMCFS LVAL.SDPV TILDPKCTAK

```

FIG 2a

	451		474
petunia	TFPNYFDVLQ	QYSKH~~~~~	~~~~~
soybean	TFPDYFEVLE	RLTKH~~~~~	~~~~~
maize	TFPDYFDVLS	TFVKN~~~~~	~~~~~
E.coli	TFPDYFEQLA	RISQAA~~~~~	~~~~~

FIG 2b

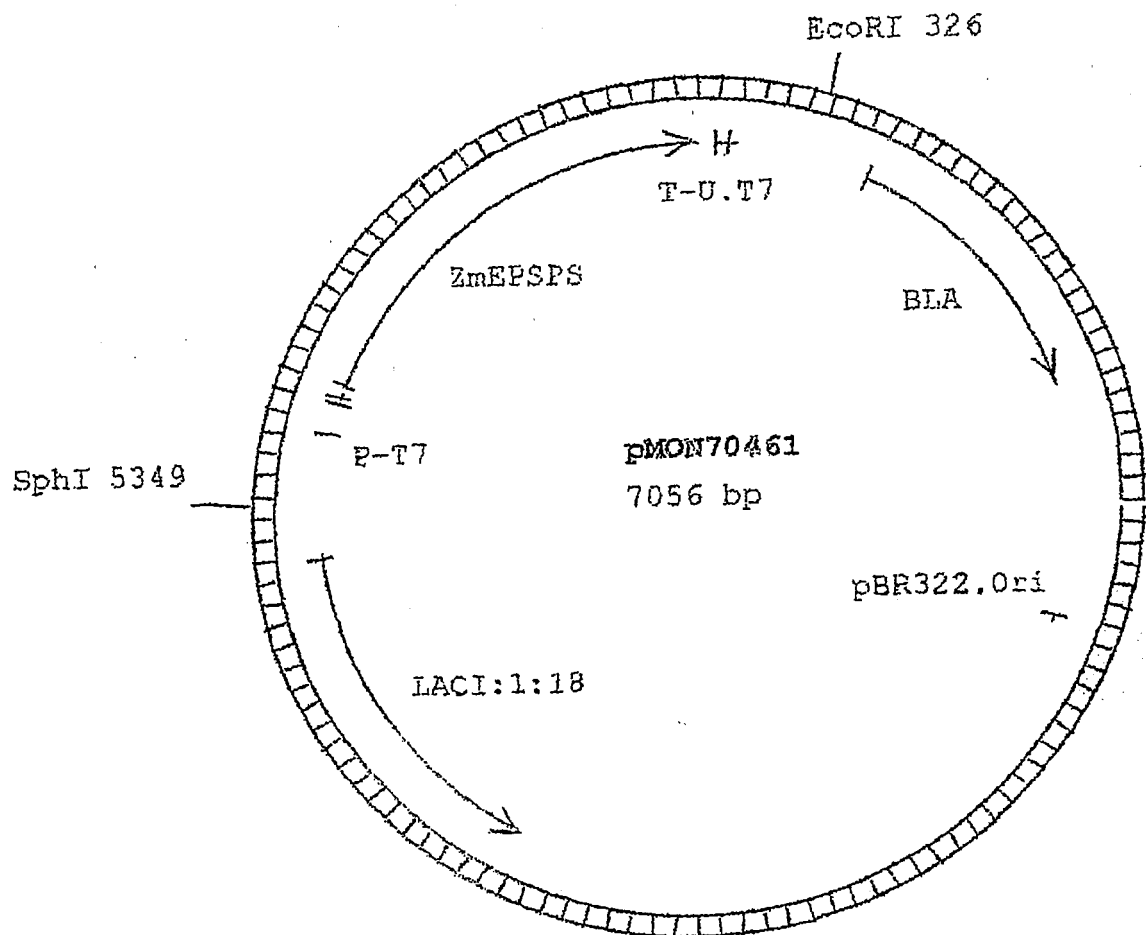


FIG 3

TIPS	TIPSMut-1-U: 5' C TTC TTG GGG AAT GCT GGA <u>ATT</u> GCA ATG CGG <u>TCA</u> TTG ACA GCA GCT GTT AC 3' (SEQ ID NO:4)
	TIPSMut-2-L: 5' GT AAC AGC TGC TGT CAA TGA CCG CAT TGC AAT TCC AGC ATT CCC CAA GAA G 3' (SEQ ID NO:5)
T102I	I1-U: 5' GG AAT GCT GGA <u>ATT</u> GCA ATG CG 3' (SEQ ID NO:6)
	I2-L: 5' CG CAT TGC <u>AAT</u> TCC AGC ATT CC 3' (SEQ ID NO:7)
P106T	mEmut-9-U: 5' GCT GGA ACT GCA ATG CGG <u>ACA</u> TTG ACA GCA GCT GTT AC 3' (SEQ ID NO:8)
	mEmut-10-L: 5' GT AAC AGC TGC TGT CAA <u>TGT</u> CCG CAT TGC AGT TCC AGC 3' (SEQ ID NO:9)
P106S	mEmut-7-U: GCTGGA ^{ACT} GCAATGCGG ^t CATTGACAGCAGCTGTTAC (SEQ ID NO:10)
	mEmut-8-L: GTAACAGCTGCTGTCAATGaCCGCATTGCAGTTCCAG ^c (SEQ ID NO:11)
P106L	H1-U: CAATGCGGCTATTGACAGCAGC (SEQ ID NO:12)
	H2-L: GCTGCTGTCAATAGCCGCATTG (SEQ ID NO:13)
P106G	P106G-U: GCAATGCGG ^{gg} ATTGACAGCAG (SEQ ID NO:14)
	P106G-L: CTGCTGTCAAT ^{cc} CCGCATTGC (SEQ ID NO:15)
P106A	P106A-U: GCAATGCGG ^g CATTGACAGCAG (SEQ ID NO:16)
	P106A-L: CTGCTGTCAATG ^c CCGCATTGC (SEQ ID NO:17)
P106V	P106V-U: GCAATGCGG ^{gt} ATTGACAGCAG (SEQ ID NO:18)
	P106V-L: CTGCTGTCAAT ^{ac} CCGCATTGC (SEQ ID NO:19)
P106L	P106L-U: GCAATGCGG ^{ctg} TTGACAGCAGCTG (SEQ ID NO:20)
	P106L-L: CAGCTGCTGTCA ^{acag} CCGCATTGC (SEQ ID NO:21)
P106I	P106I-U: GCAATGCGG ^{atc} TTGACAGCAGC (SEQ ID NO:22)
	P106I-L: GCTGCTGTCA ^{aga} TCCGCATTGC (SEQ ID NO:23)
P106M	P106M-U: GCAATGCGG ^{atg} TTGACAGCAGC (SEQ ID NO:24)
	P106M-L: GCTGCTGTCA ^{aca} TCCGCATTGC (SEQ ID NO:25)

FIG 4a

P106C	P106C-U: GCAATGCGGtgtTTGACAGCAGCTG (SEQ ID NO:26)
	P106C-L: CAGCTGCTGTCAAacaCCGCATTGC (SEQ ID NO:27)

ZmAroA-1	AATAGCATGCCCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCAGCCCATCAAGG AGATC (SEQ ID NO:40)
ZmAroA-2	ATTGAATTCGAGCTCATTAATTCTTGACGAAAGTGCTC (SEQ ID NO:41)
ZmAroA-3	GTTTCCACGGCGTGTCATGgCCGGCGCCGAGGAGATCG (SEQ ID NO:42)
ZmAroA-4	CGATCTCCTCGGCGCCGGcCATGCACGCCGTGGAAAC (SEQ ID NO:43)

FIG 4b

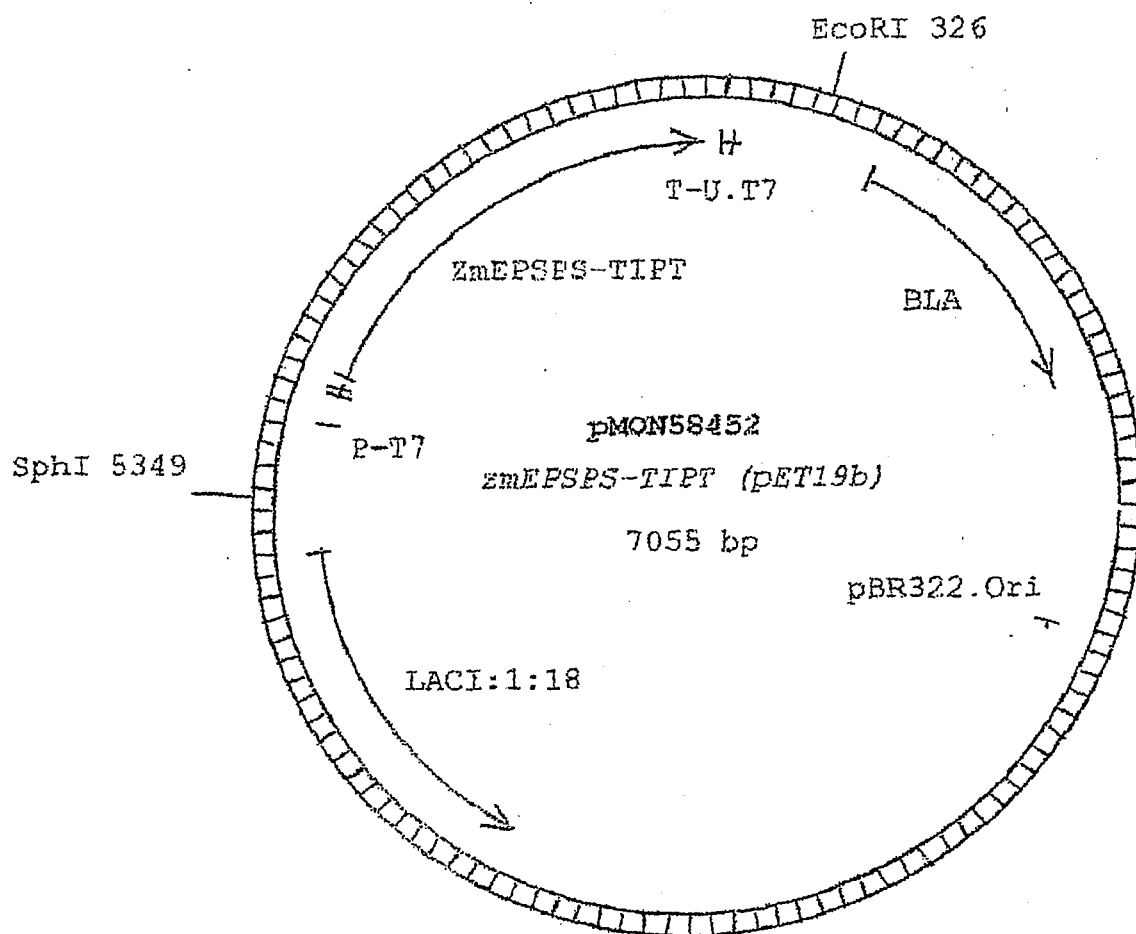


FIG 5

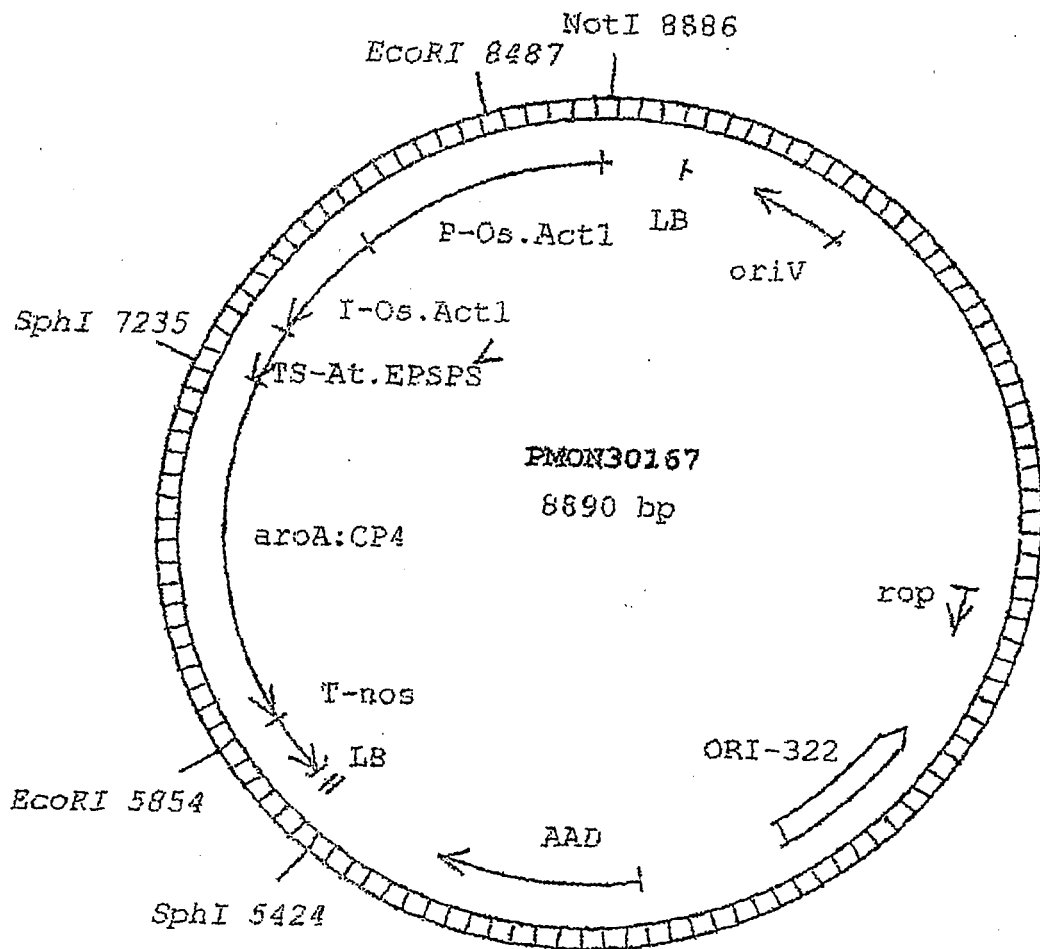


FIG 6

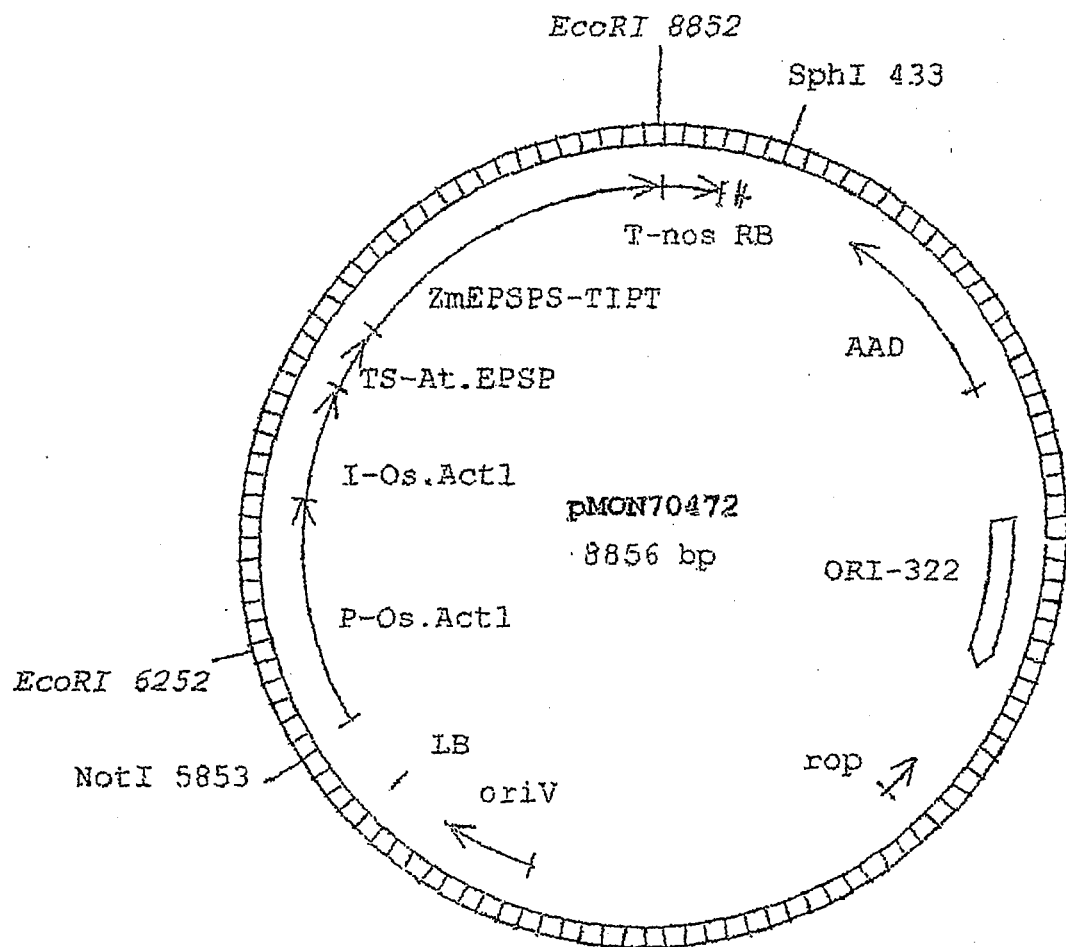


FIG 7

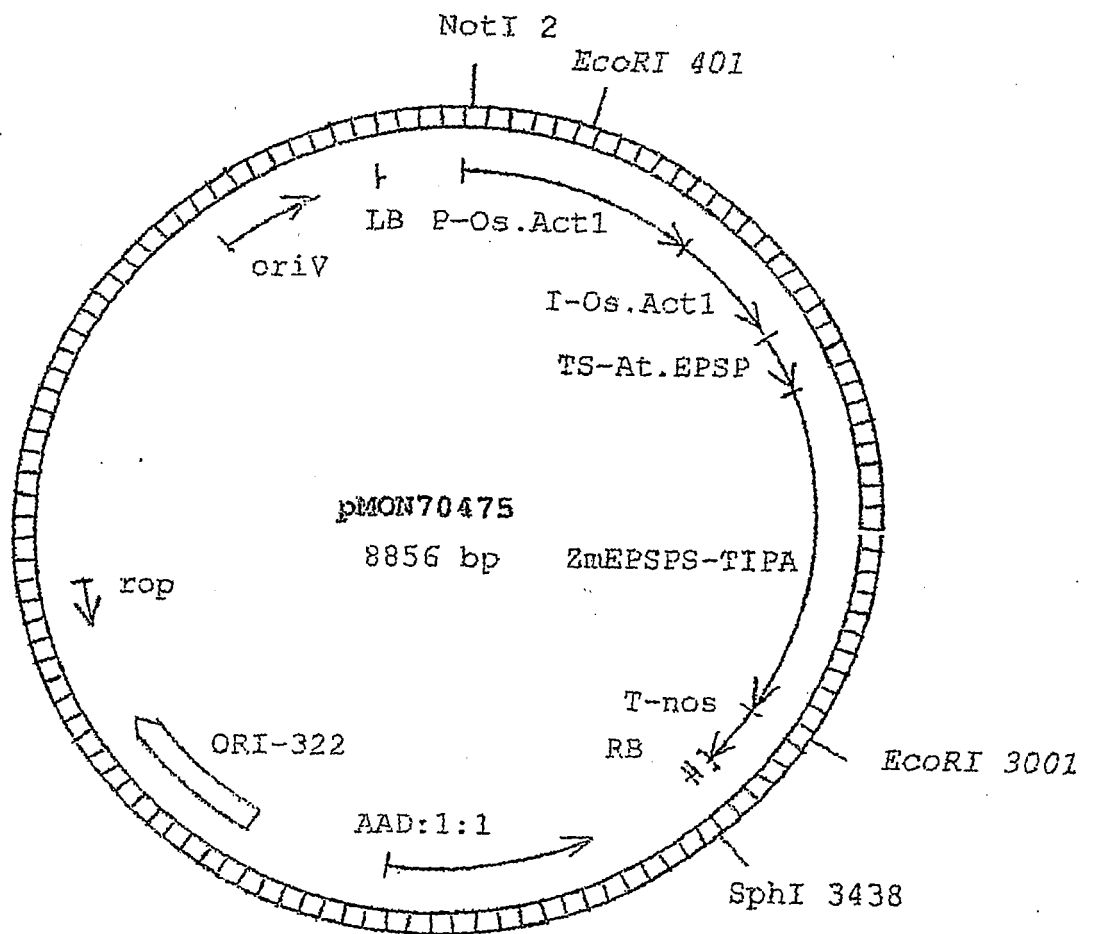


FIG 8

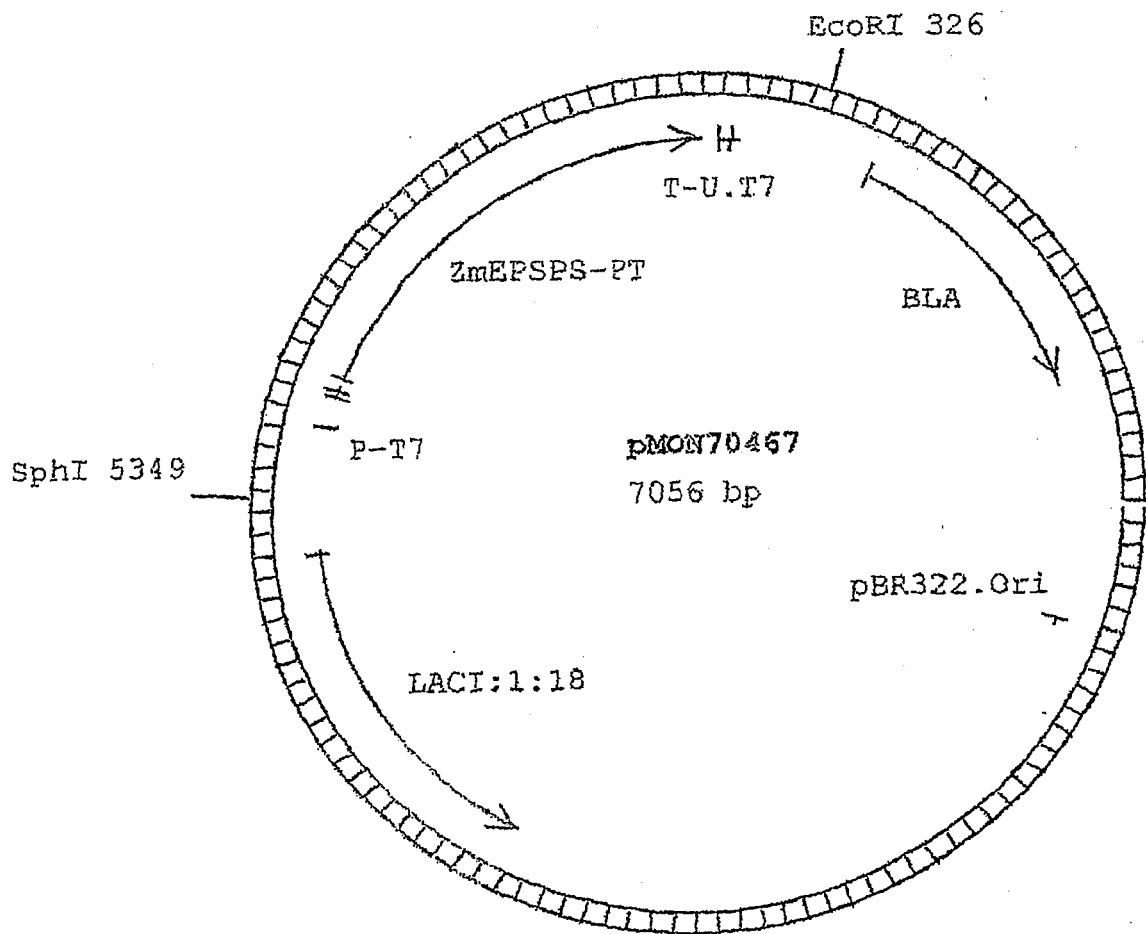


FIG 9

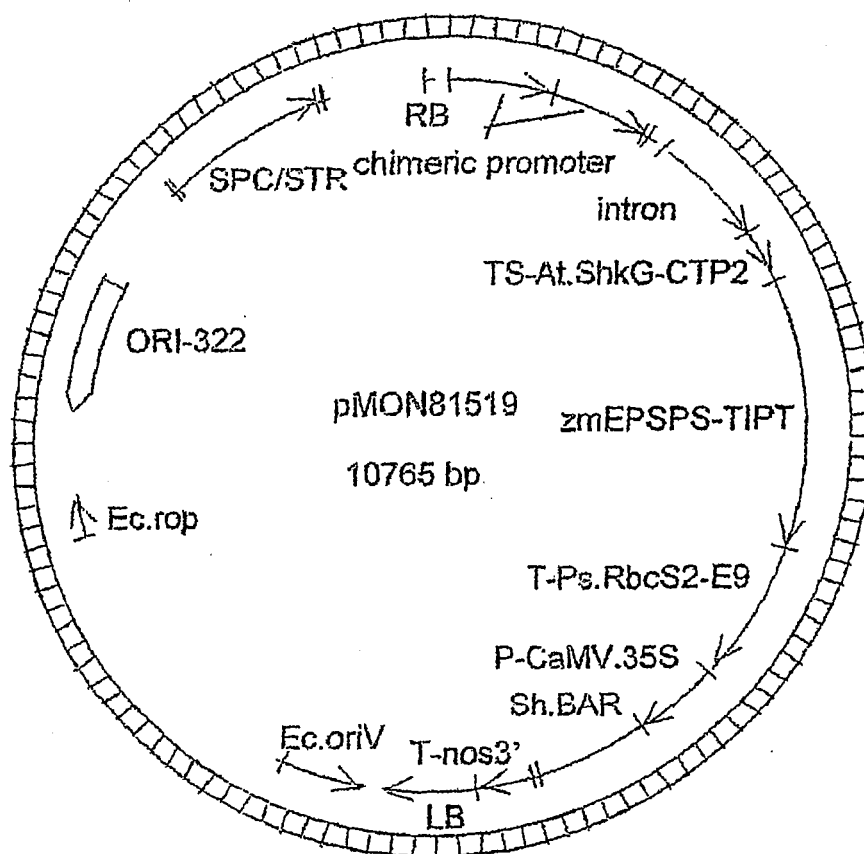


FIG 10

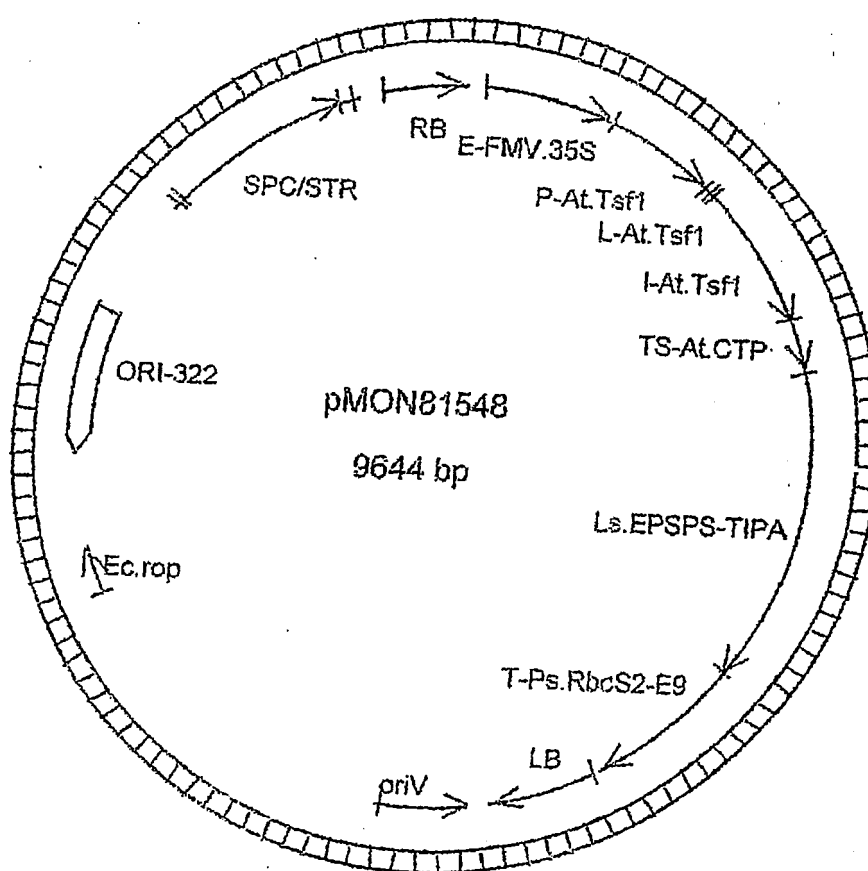


FIG 11

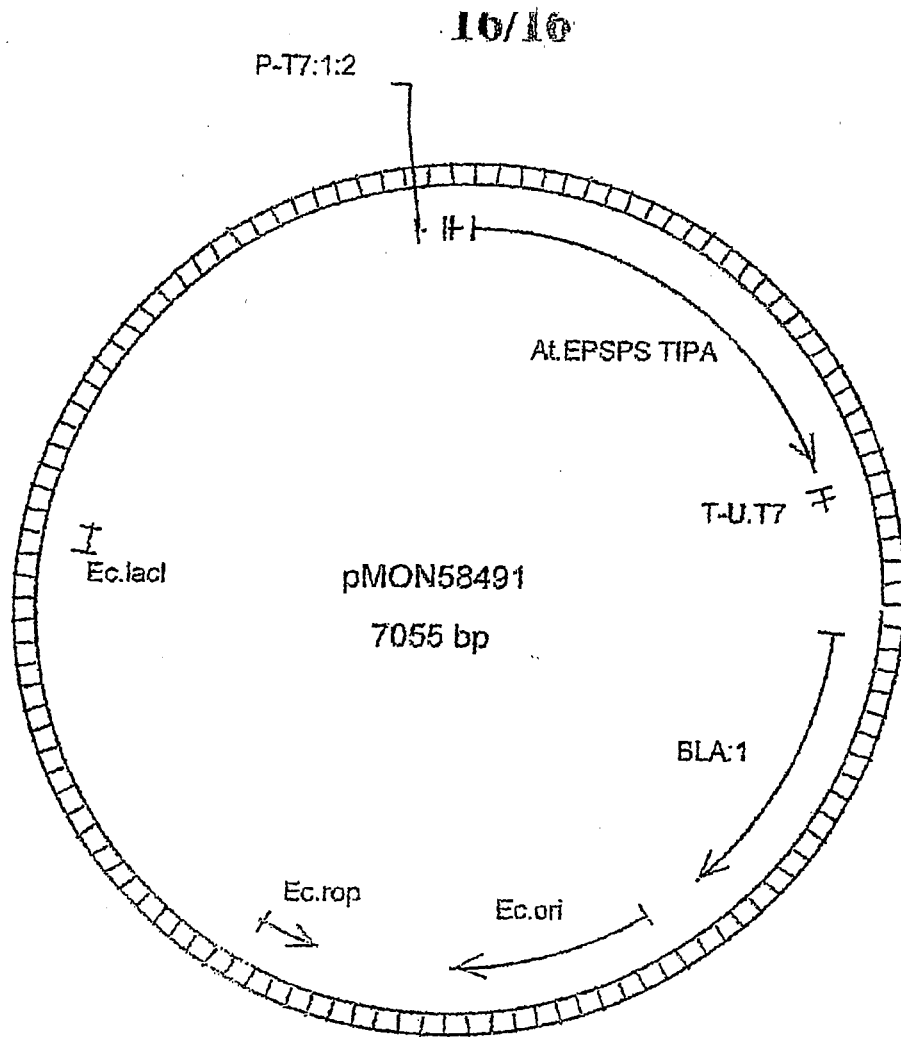


FIG 12