

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.05.02	(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC 9330 ZIONSVILLE ROAD INDIANAPOLIS, INDIANA 45268-1054	US
(30) Prioridade(s): 2004.04.30 US 567052 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2011.04.13	(72) Inventor(es): DONALD J. MERLO TERRY R. WRIGHT JUSTIN M. LIRA NICOLE ARNOLD	US US US US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.03.06 090/2013	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **NOVO GENE DE RESISTÊNCIA A HERBICIDA**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA NOVAS PLANTAS QUE NÃO SÓ SÃO RESISTENTES A 2,4-D E OUTROS HERBICIDAS FENOXIAUXÍNICOS, COMO TAMBÉM A HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONATO. ATÉ AO PRESENTE, NÃO EXISTIA QUALQUER EXPECTATIVA OU SUGESTÃO DE SER POSSÍVEL PRODUIR UMA PLANTA COM AMBAS ESTAS PROPRIEDADES VANTAJOSAS PELA INTRODUÇÃO DE UM ÚNICO GENE. O PRESENTE INVENTO TAMBÉM INCLUI PLANTAS QUE PRODUZEM UMA OU MAIS ENZIMAS DO PRESENTE INVENTO SOZINHAS OU JUNTAS CONJUNTAMENTE COM OUTRO GENE DE RESISTÊNCIA A HERBICIDA, DE PREFERÊNCIA UM GENE DE RESISTÊNCIA A GLIFOSATO, DE MODO A PROPORCIONAR UM CONTROLO DE ERVAS DANINHAS MAIS ABRANGENTE E MAIS ROBUSTO, FLEXIBILIDADE DE TRATAMENTO AUMENTADA E OPÇÕES DE GESTÃO MELHORADA DE RESISTÊNCIA A HERBICIDA. MAIS ESPECIFICAMENTE, AS ENZIMAS E GENES PREFERIDOS PARA UTILIZAÇÃO DE ACORDO COM O PRESENTE INVENTO SÃO AQUI DENOMINADOS COMO GENES E PROTEÍNAS AAD (ARILOXIALCANOATO-DIOXIGENASE). NÃO FOI ANTERIORMENTE RELATADO QUE A ENZIMA DIOXIGENASE DEPENDENTE DE Α-CETOGLUTARATO TENHA A CAPACIDADE DE DEGRADAR HERBICIDAS DE DIFERENTES CLASSES QUÍMICAS E MODOS DE ACÇÃO. ESTA CONSTATAÇÃO ALTAMENTE INOVADORA É A BASE DAS SIGNIFICATIVAS OPORTUNIDADES DAS CARACTERÍSTICAS DE CULTURAS TOLERANTES A HERBICIDAS, BEM COMO DO DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DE MARCADORES SELECIONÁVEIS. O PRESENTE INVENTO TAMBÉM INCLUI MÉTODOS RELACIONADOS DE CONTROLO DE ERVAS DANINHAS. O PRESENTE INVENTO PERMITE UTILIZAR NOVAS COMBINAÇÕES DE HERBICIDAS DE NOVAS FORMAS. ALÉM DISSO, O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA NOVOS MÉTODOS PARA PREVENIR A FORMAÇÃO DE, E CONTROLAR, ERVAS DANINHAS QUE SÃO RESISTENTES (OU NATURALMENTE MAIS TOLERANTES) A UM OU MAIS HERBICIDAS, TAL COMO O GLIFOSATO.

RESUMO**"Novo gene de resistência a herbicida"**

O presente invento proporciona novas plantas que não só são resistentes a 2,4-D e outros herbicidas fenoxiauxínicos, como também a herbicidas ariloxifenoxipropionato. Até ao presente, não existia qualquer expectativa ou sugestão de ser possível produzir uma planta com ambas estas propriedades vantajosas pela introdução de um único gene. O presente invento também inclui plantas que produzem uma ou mais enzimas do presente invento sozinhas ou juntas conjuntamente com outro gene de resistência a herbicida, de preferência um gene de resistência a glifosato, de modo a proporcionar um controlo de ervas daninhas mais abrangente e mais robusto, flexibilidade de tratamento aumentada e opções de gestão melhorada de resistência a herbicida. Mais especificamente, as enzimas e genes preferidos para utilização de acordo com o presente invento são aqui denominados como genes e proteínas AAD (ariloxialcanoato-dioxigenase). Não foi anteriormente relatado que a enzima dioxigenase dependente de α -cetoglutarato tenha a capacidade de degradar herbicidas de diferentes classes químicas e modos de acção. Esta constatação altamente inovadora é a base das significativas oportunidades das características de culturas tolerantes a herbicidas, bem como do desenvolvimento de tecnologia de marcadores seleccionáveis. O presente invento também inclui métodos relacionados de controlo de ervas daninhas. O presente invento permite utilizar novas combinações de herbicidas de novas formas. Além disso, o presente invento proporciona novos métodos para prevenir a formação de, e controlar, ervas daninhas que são resistentes (ou naturalmente mais tolerantes) a um ou mais herbicidas, tal como o glifosato.

DESCRIÇÃO

"Novo gene de resistência a herbicida"

Antecedentes do invento

As ervas daninhas podem esgotar rapidamente os nutrientes valiosos do solo necessários para as culturas e outras plantas desejáveis. Existem muitos tipos diferentes de herbicidas utilizados actualmente para o controlo de ervas daninhas. Um herbicida extremamente popular é o glifosato.

Foram desenvolvidas culturas, tais como milho, soja, colza, algodão, beterraba açucareira, trigo, relva e arroz, que são resistentes a glifosato. Assim, pode pulverizar-se glifosato em campos com culturas activas de milho resistente a glifosato, por exemplo, para controlar as ervas daninhas sem danificar significativamente as plantas de milho.

Com a introdução de culturas tolerantes a glifosato (GTC) modificadas por engenharia genética na década de 90, os agricultores ficaram com uma ferramenta simples, conveniente, flexível e barata para controlar uma vasta gama de ervas daninhas de folha larga e gramíneas, sem paralelo na agricultura. Consequentemente, os produtores adoptaram rapidamente as GTC e em muitos casos abandonaram muitas das melhores práticas agronómicas aceites, tais como rotação de culturas, rotação do modo de acção do herbicida, mistura em tanque, incorporação de controlo mecânico de ervas daninhas com controlo químico e de cultura. Actualmente encontram-se disponíveis comercialmente soja, algodão, milho e colza tolerantes a glifosato nos Estados Unidos e noutros locais do hemisfério ocidental. Mais GTC (e.g., trigo, arroz, beterraba açucareira, relva, etc.) estão preparadas para introdução desde que sejam aceites pelo mercado global. Muitas outras espécies resistentes a glifosato estão em estágios experimentais ou de desenvolvimento (e.g., alfafa, cana de açúcar, girassol, beterrabas, ervilhas, cenoura, pepino, alface, cebola, morangos, tomate e tabaco; espécies de

silvicultura tais como choupo e liquidâmbar; e espécies de horticultura tais como margarida, petúnia e begónias; consultar a página de internet "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005"). Adicionalmente, o custo do glifosato desceu drasticamente nos últimos anos a ponto de poucos programas de controlo de ervas daninhas convencionais poderem competir eficazmente em preço e em desempenho com os sistemas GTC glifosato.

O glifosato tem sido utilizado com sucesso em queimadas e outras áreas sem cultura para controlo da vegetação total durante mais de 15 anos. Em muitos casos, tal como com GTC, utilizou-se glifosato 1-3 vezes por ano durante 3, 5, 10 até 15 anos seguidos. Estas circunstâncias levaram a um excesso de confiança na tecnologia do glifosato e das GTC e colocaram uma elevada pressão de selecção sobre as espécies de ervas daninhas nativas para plantas que são naturalmente mais tolerantes a glifosato ou que desenvolveram um mecanismo de resistência à actividade herbicida do glifosato.

A utilização extensiva de programas de controlo de ervas daninhas exclusivamente com glifosato está a resultar na selecção de ervas daninhas resistentes a glifosato e a seleccionar a propagação de espécies de ervas daninhas que são inerentemente mais tolerantes a glifosato do que a maioria das espécies alvo (i.e., variações nas ervas daninhas). (Ng *et al.*, 2003; Simarmata *et al.*, 2003; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller *et al.*, 2003; Heap, 2005; Murphy *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002.) Embora o glifosato tenha sido vastamente utilizado globalmente durante mais de 15 anos, apenas foram relatados alguns casos de ervas daninhas que desenvolveram resistência a glifosato (Heap, 2005); no entanto, a maioria destes casos foi identificada nos últimos 3-5 anos. As ervas daninhas resistentes incluem tanto espécies de gramíneas, como de folha larga - *Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis* e *Plantago lanceolata*. Adicionalmente, ervas daninhas que antes da vasta utilização de GTC não eram um problema agronómico estão agora a tornar-se

mais prevalentes e difíceis de controlar no contexto das GTC, que compreende >80% da área de algodão e soja dos EUA e >20% da área de milho dos EUA (Gianessi, 2005). Estas variações das ervas daninhas estão a ocorrer predominantemente (mas não exclusivamente) com ervas daninhas de folha larga, difíceis de controlar. Alguns exemplos incluem as espécies *Ipomoea*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum* e *Commelina*.

Em áreas em que os agricultores se deparam com ervas daninhas resistentes a glifosato ou com uma variação para espécies de ervas daninhas mais difíceis de controlar, os agricultores podem compensar as debilidades do glifosato por mistura em tanque ou por alternância com outros herbicidas que controlarão as ervas daninhas que falharam. Um parceiro popular e eficaz para mistura em tanque para controlar ervas de folha larga que escapam tem sido em muitos casos o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D): o 2,4-D tem sido utilizado em agronomia e em situações sem cultura para controlo de ervas daninhas de folha larga de largo espectro há mais de 60 anos. Têm sido relatados casos individuais de espécies mais tolerantes, mas o 2,4-D permanece um dos herbicidas mais utilizados globalmente. Uma limitação a uma maior utilização de 2,4-D é a sua selectividade muito baixa em culturas de dicotiledóneas, tais como soja ou algodão, e portanto 2,4-D não é tipicamente utilizado em culturas sensíveis de dicotiledóneas (e geralmente nem nas proximidades). Adicionalmente, a utilização de 2,4-D em culturas de gramíneas é algo limitada pela natureza das lesões à cultura que podem ocorrer. O 2,4-D em combinação com glifosato tem sido utilizado para proporcionar um tratamento mais robusto das queimadas antes do plantio soja e algodão por plantação directa; no entanto, devido à sensibilidade destas espécies de dicotiledóneas a 2,4-D, estes tratamentos de queimadas devem ocorrer pelo menos 14-30 dias antes de plantar (Agriliance, 2003).

O 2,4-D encontra-se na classe de herbicidas dos fenoxiacidos, tal como o MCPA, o mecoprop e o dicloroprop. O 2,4-D tem sido utilizado em muitas culturas de

monocotiledóneas (tais como milho, trigo e arroz) para o controlo selectivo de ervas daninhas de folha larga sem danificar gravemente as plantas da cultura pretendida. O 2,4-D é um derivado sintético da auxina que actua desregulando a homeostase hormonal celular normal e impede um crescimento equilibrado e controlado; no entanto, o modo de acção exacto é ainda desconhecido.

O 2,4-D apresenta diferentes níveis de selectividade em determinadas plantas (e.g., as dicotiledóneas são mais sensíveis do que as gramíneas). O metabolismo diferencial do 2,4-D por diferentes plantas é uma das explicações para os níveis de selectividade variáveis. Em geral, as plantas metabolizam 2,4-D lentamente, pelo que a resposta variável das plantas ao 2,4-D pode ser explicada mais provavelmente pela diferente actividade no(s) local(is) alvo (WSSA, 2002). O metabolismo das plantas do 2,4-D ocorre tipicamente através de um mecanismo em duas fases, tipicamente hidroxilação seguida por conjugação com aminoácidos ou glucose (WSSA, 2002).

Ao longo do tempo, as populações microbianas desenvolveram uma via alternativa e eficaz para a degradação deste xenobiótico em particular, que resulta na mineralização completa de 2,4-D. As aplicações sucessivas do herbicida seleccionam os micróbios que podem utilizar o herbicida como fonte de carbono para crescimento, o que lhes dá uma vantagem competitiva no solo. Por este motivo, o 2,4-D é actualmente formulado de modo a ter um tempo de semivida no solo relativamente curto e não se verificam quaisquer efeitos de arrastamento significativos para as culturas subsequentes. Tal constitui mais uma vantagem para a utilidade do herbicida 2,4-D.

Um dos organismos que tem sido investigado extensivamente devido à sua capacidade de degradar 2,4-D é *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). O gene que codifica a primeira etapa enzimática na via de mineralização é *tfdA*. Consultar patente U.S. 6 153 401 e N.º de acesso GENBANK M16730. *TfdA* catalisa a conversão do ácido 2,4-D em diclorofenol (DCP) através de uma

reação pela dioxigenase dependente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). O DCP apresenta baixa actividade herbicida comparativamente com 2,4-D. O *TfdA* tem sido utilizado em plantas transgênicas para conferir resistência a 2,4-D em plantas dicotiledóneas (e.g., algodão e tabaco) que são normalmente sensíveis a 2,4-D (Streber *et al.* (1989), Lyon *et al.* (1989), Lyon (1993) e patente U.S. 5 608 147).

Foi identificado um elevado número de genes do tipo *tfdA* que codificam proteínas capazes de degradar 2,4-D a partir do ambiente e foram depositados na base de dados Genbank. Muitos dos homólogos são semelhantes a *tfdA* (>85% de identidade de aminoácidos) e apresentam propriedades enzimáticas semelhantes a *tfdA*. Contudo, existem alguns homólogos que têm uma identidade com *tfdA* significativamente inferior (25-50%), mas apresentam os resíduos característicos associados a dioxigenases de Fe^{2+} de α -cetoglutarato dioxigenase. Assim, não são óbvias quais são as especificidades de substrato destas dioxigenases divergentes.

Um exemplo único de baixa homologia com *tfdA* (28% de identidade de aminoácidos) é *rdpA* de *Sphingobium herbicidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002). Demonstrou-se que esta enzima catalisa a primeira etapa na mineralização de (R)-diclorprop (e outros ácidos (R)-fenoxipropiónicos) bem como de 2,4-D (um ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al.*, 2003). Sequências do gene *rdpA* foram publicadas com os números de acesso na Genebank AJ628859, AF516751 e AF516752. Embora os organismos que degradam ácido fenoxipropiónico tenham sido descritos já há algum tempo, até recentemente tinham sido feitos poucos progressos na caracterização desta via (Horvath *et al.*, 1990). Uma complicação adicional na degradação de diclorprop é a estereoespecificidade (R vs. S) envolvida tanto na absorção (Kohler, 1999), como na oxidação inicial de diclorprop (Westendorf *et al.*, 2003). A expressão heteróloga de *rdpA* noutros micróbios ou a transformação deste gene em plantas não foi até hoje relatada. A literatura tem-se focado principalmente nos homólogos mais próximos de *tfdA* que

degradam principalmente os ácidos fenoxiacéticos aquirais (e.g., 2,4-D).

O desenvolvimento de novas tecnologias de culturas tolerantes a herbicidas (HTC) tem tido sucesso limitado devido principalmente à eficácia, baixo custo e conveniência das GTC. Consequentemente tem-se registado uma elevada taxa de adopção de GTC entre os produtores. Tal criou um baixo incentivo para desenvolver novas tecnologias HTC.

As subestruturas químicas ariloxialcanoato são a entidade comum a muitos herbicidas comercializados incluindo as fenoxiauxinas (tais como 2,4-D e diclorprop), piridiloxiauxinas (tais como fluroxipir e triclopir), inibidores de acetil-coenzima A-carboxilase (ACCase) de ariloxifenoxipropionatos (AOPP) (tais como haloxifop, quizalofop e diclofop) e inibidores de protoporfirinogénio oxidase IX de fenoxiacetato substituído em 5 (tais como piraflufeno e flumiclorac). No entanto, estas classes de herbicidas são todas bastante diferentes e não existe qualquer evidência na literatura actual de vias de degradação comuns entre estas classes químicas. WO 98/02562 divulga genes quiméricos que são utilizados para a geração de resistência em plantas a vários herbicidas incluindo inibidores de HPPD e EPSPS. A identificação de uma enzima multifuncional para a degradação de herbicidas que abranja modos múltiplos seria não só única como também valiosa como uma característica de HTC.

Sumário sucinto do invento

São proporcionadas novas plantas que não só são resistentes a 2,4-D, mas também a herbicidas AOPP. Até agora não existia qualquer expectativa ou sugestão de que poderia ser produzida uma planta com ambas estas propriedades vantajosas através da introdução de um único gene. Estão também incluídas plantas que produzem uma ou mais enzimas do presente invento juntas, conjuntamente com um ou mais genes de resistência a herbicida, incluindo entre outros os genes de resistência a glifosato, imidazolinona e glufosinato, de modo

a proporcionar plantas tolerantes a herbicida compatíveis com um controlo de ervas daninhas mais alargado e robusto e opções de gestão de resistência a herbicida. O presente invento inclui adicionalmente métodos e composições que utilizam homólogos dos genes e proteínas aqui exemplificados.

São proporcionadas plantas monocotiledóneas e dicotiledóneas tolerantes a 2,4-D, AOPP e a um ou mais herbicidas disponíveis comercialmente (e.g., glifosato, imidazolinonas, glufosinato, sulfonilureias, dicamba, bromoxinil e outros). Também se divulgam vectores compreendendo sequências de ácido nucleico responsáveis por tal tolerância a herbicida, bem como métodos de utilização de tais plantas tolerantes e combinações de herbicidas para controlo de ervas daninhas e prevenção de variações nas populações de ervas daninhas. O presente invento permite a utilização de novas combinações de herbicidas de novas formas. Além disso, o presente invento proporciona novos métodos para prevenir o desenvolvimento e controlar estirpes de ervas daninhas que são resistentes a um ou mais herbicidas, tal como glifosato. O presente invento permite novas utilizações de novas combinações de herbicidas e culturas, incluindo aplicação pré-plantio numa área que será utilizada para plantio imediatamente antes do plantio com sementes para plantas que de outra forma seriam sensíveis a esse herbicida (tal como 2,4-D).

Também se descreve a identificação de uma enzima que não só é capaz de degradar 2,4-D, mas que surpreendentemente também apresenta novas propriedades, que distinguem a enzima do presente invento das proteínas *tfdA* previamente conhecidas, por exemplo. Mais especificamente, o presente invento refere-se à utilização de uma enzima que é capaz de degradar tanto 2,4-D, como herbicidas AOPP, de uma forma enantioespecífica. Não se tinha reportado anteriormente qualquer enzima dioxigenase dependente de α -cetoglutarato com a capacidade de degradar herbicidas de diferentes classes químicas e modos de acção. A enzima e o gene preferidos para utilização de acordo com o presente invento denominam-se aqui AAD-1

(AriloxiAlcanoato-Dioxigenase). Esta constatação altamente inovadora é a base de oportunidades de significativas características de HTC e marcadores seleccionáveis.

Não existia qualquer motivação anterior para produzir plantas compreendendo um gene *AAD-1* (de preferência um polinucleótido *AAD-1* que tem uma sequência otimizada para expressão num ou mais tipos de plantas, tal aqui como exemplificado) e não existia qualquer expectativa de que tais plantas pudessem produzir eficazmente uma enzima *AAD-1* para tornar as plantas resistentes não só a herbicidas fenoxiácidos (tal como 2,4-D), mas também a herbicidas AOPP (tais como quizalofop, haloxifop, *et al.*). Assim, o presente invento proporciona muitas vantagens que até agora não se pensava serem possíveis na especialidade.

Descreve-se também a identificação e utilização de genes que codificam enzimas ariloxialcanoato-dioxigenase que são capazes de degradar herbicidas fenoxiauxínicos e ariloxifenoxipropionatos. Também se divulgam métodos para rastrear proteínas quanto a estas actividades, incluindo a degradação de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, outros herbicidas auxínicos de fenoxialcanoato e herbicidas de ariloxifenoxipropionato, através de uma enzima *AAD-1* expressa recombinantemente. O presente invento também inclui métodos para controlar ervas daninhas em que os referidos métodos compreendem aplicar um ou mais herbicidas AOPP, fenoxiauxina ou outros ariloxialcanoatos a plantas compreendendo um gene *AAD-1*. Também se proporcionam métodos para utilizar um gene *AAD-1* como um marcador seleccionável para identificar células vegetais e plantas completas transformadas com *AAD-1*, opcionalmente incluindo um, dois ou mais genes exógenos inseridos simultaneamente nas células vegetais alvo. Os métodos do presente invento incluem seleccionar células transformadas que são resistentes a níveis adequados de um herbicida. Descrevem-se adicionalmente métodos para preparar um polipéptido com a actividade biológica de ariloxialcanoato-dioxigenase, por cultura de plantas e/ou células do presente invento.

Descrição sucinta das figuras

A **figura 1** apresenta um esquema geral para clivagem por dioxigenase de herbicidas fenoxiauxínicos ou AOPP.

A **figura 2** apresenta perda de actividade herbicida de uma solução de 2,4-D tratada com AAD-1.

A **figura 3** apresenta a perda de actividade herbicida de uma solução de haloxifop tratada com AAD-1.

A **figura 4** apresenta os fenóis que se antecipam produzir a partir de herbicidas representativos catalisados por AAD-1.

A **figura 5** apresenta a produção de 2,4-Diclorofenol por AAD-1 recombinante.

As **figuras 6A e 6B** apresentam a produção de fenol por AAD-1 recombinante a partir de vários substratos herbicidas.

A **figura 7** apresenta a velocidade da reacção de AAD-1 em função da concentração de substrato para quatro substratos herbicidas.

As **figuras 8A e 8B** demonstram que AAD-1 (v3) foi expresso igualmente em folhas de *Arabidopsis* de diferentes idades mas continuou a acumular-se ao longo dos 25 dias da experiência. As plantas que não foram pulverizadas com o herbicida 2,4-D (painel A) expressaram um pouco mais de AAD-1 (v3) do que as que foram pulverizadas (painel B). As barras representam a média \pm EPM de 5 folhas de 5 plantas diferentes, com a percentagem de expressão de AAD-1 (v3) normalizada para a proteína solúvel total. As barras claras representam as terceiras folhas jovens (N-3) recolhidas do topo, as barras escuras representam as 5.^{as} folhas mais velhas da parte inferior.

As **figuras 9A, 9B e 9C** apresentam as lesões nas plantas *Arabidopsis* após tratamento com 2,4-D. Trataram-se cada uma das quatro linhas diferentes com quatro doses diferentes de 2,4-D e classificaram-se as lesões 4 (painel A) e 14 (painel B) dias após tratamento. Determinou-se também a sua expressão de AAD-1 (v3) em folhas utilizando ELISA (painel C). Os resultados são a média \pm EPM de cinco folhas de cinco plantas diferentes que receberam o mesmo tratamento.

A **figura 10** ilustra que *Arabidopsis* transformada com pDAB3230 (AAD-1 + EPSPS) apresenta um nível de tolerância a glifosato a 7 DAT >14 vezes ao tipo selvagem e linhas de *Arabidopsis* transformadas com controlo.

A **figura 11** apresenta a dose-resposta de suspensões de calos de milho a R-haloxifop.

A **figura 12** demonstra que para ci-halofop fenol 1 μ M, o crescimento é ainda 76% relativamente ao controlo sem ci-halofop fenol.

A **figura 13** ilustra os dados de dose-resposta num evento transgénico, 3404-006, a haloxifop.

A **figura 14** apresenta as respostas de vários eventos de clones transformados com AAD-1 (v3) e não transformados a doses letais de dois herbicidas AOPP (haloxifop e quizalofop) aplicados como uma pulverização pós-emergência 1 semana antes.

A **figura 15** apresenta três diferentes linhagens T2 de transformações 3404 que foram pré-rastreadas com Liberty® para remover os nullos, que foram seleccionadas para comparar a sua tolerância a quizalofop relativamente à sua expressão de AAD-1. A expressão foi medida em 14 DAT (dados não apresentados) e em 30 DAT.

A **figura 16** apresenta milho transformado com AAD-1 (v3) tolerante a 8X a taxa de campo de quizalofop (Assure II) em condições de campo.

A **figura 17** ilustra os dados de embriões de milho imaturos cultivados em meio contendo ci-halofop.

A **figura 18** apresenta uma análise de transferência "Western" de calos de soja transformados com o gene *AAD-1* (V3) indicando que as células de calos expressam a proteína *AAD-1* (v3).

A **figura 19** apresenta as curvas ajustadas às taxas de degradação de 2,4-D por *AAD-2* (v1) relativamente a *AAD-1* (v1).

A **figura 20** apresenta a resposta de *Arabidopsis* T₁ transformada com *AAD-1* v3 (otimizado para plantas) ou *AAD-1* (v2) (nativo), *AAD-2* (v1) (nativo) ou *AAD-2* (v2) (otimizado para plantas) a uma gama de taxas de 2,4-D aplicadas pós-emergência. Cada vaso representa um evento de transformação individual no interior de cada família de genes T₁.

A **figura 21** apresenta análise de transferência "western" de plantas de *Arabidopsis* T₁ individuais transformadas com *AAD-2* (v1) nativo. Tal demonstra que as plantas que expressam a proteína *AAD-2* (v1) sofrem lesões graves com tratamentos com 2,4-D de 200 g ae (equivalentes ácidos)/ha, que normalmente causam poucas lesões a *Arabidopsis* transformada com *AAD-1* (v2) nativo ou *AAD-1* (v3) otimizado para plantas. Identifica-se a proteína *AAD-2* no gel. Detectaram-se várias bandas de fundo em amostras transformadas com *AAD-2* e transformadas com *Pat/Cry1F*.

A **figura 22** mostra que a actividade relativa de *AAD-2* (v1) nos substratos foi 2,4-D = diclorprop > (R,S)-haloxifop >> (R)-haloxifop.

Descrição sucinta das sequências

SEQ ID NO:1 é a sequência de um iniciador directo utilizado para amplificar o gene *rdpA/AAD-1* (v1).

SEQ ID NO:2 é a sequência de um iniciador inverso utilizado para amplificar o gene *rdpA/AAD-1 (v1)*.

SEQ ID NO:3 é a sequência de nucleótidos de *AAD-1 (v1)* de *Sphingobium herbicidovorans*.

SEQ ID NO:4 é a sequência de ácido nucleico do gene *AAD-1* nativo com um local de restrição NotI interno removido. Este gene é denominado *AAD-1 (v2)*. A sequenciação de ADN confirmou que foi gerado o produto de PCR correcto, mas efectuou-se uma alteração inadvertida no aminoácido n.º 212 de arginina para cisteína.

SEQ ID NO:5 é uma sequência de ADN de *AAD-1 (v3)* "otimizado para plantas". Este "gene" codifica SEQ ID NO:11, que é igual à SEQ ID NO:9 excepto pela adição de um resíduo de alanina na segunda posição. O codão de alanina (GCT) adicional foi incluído para codificar um local Nco I (CCATGG) abrangendo o codão de iniciação ATG, para permitir as subsequentes operações de clonagem.

SEQ ID NO:6 ("rdpA(ncoI)") e **SEQ ID NO:7** ("3'saci") foram utilizadas para amplificar um fragmento de ADN utilizando o sistema de PCR Fail Safe (Epicenter).

SEQ ID NO:8 é outro iniciador de PCR ("BstEII/Del NotI") que foi utilizado com o iniciador "3' SacI".

SEQ ID NO:9 é a sequência de aminoácidos nativa codificada pelo gene *AAD-1 (v1)* de *Sphingobium herbicidovorans*.

SEQ ID NO:10 é a sequência de aminoácidos codificada pela sequência de ADN *AAD-1 (v2)* de SEQ ID NO:4.

SEQ ID NO:11 é a sequência de aminoácidos codificada pela sequência de ADN de *AAD-1 (v3)* otimizado para plantas de SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO:12 é a sequência ADN do gene *AAD-2 (v1)* nativo.

SEQ ID NO:13 é a sequência de aminoácidos da proteína *AAD-2 (v1)*.

SEQ ID NO:14 é um iniciador directo utilizado para amplificar ADN de *AAD-2 (v1)* para clonagem.

SEQ ID NO:15 é um iniciador inverso utilizado para amplificar ADN de *AAD-2 (v1)* para clonagem.

SEQ ID NO:16 é o iniciador directo M13.

SEQ ID NO:17 é o iniciador inverso M13.

SEQ ID NO:18 é um iniciador directo utilizado para amplificar ADN de *AAD-2 (v1)* para clonagem.

SEQ ID NO:19 é um iniciador inverso utilizado para amplificar ADN de *AAD-2 (v1)* para clonagem.

SEQ ID NO:20 é a proteína de soja EPSPS nativa.

SEQ ID NO:21 é uma sequência de proteína de soja EPSPS duplamente mutada, contendo uma mutação no resíduo 183 (a treonina da proteína nativa é substituída por isoleucina) e no resíduo 187 (a prolina da proteína nativa é substituída por serina).

SEQ ID NO:22 é a sequência de ADN desviada para soja que codifica a proteína EPSPS de **SEQ ID NO:21**.

SEQ ID NO:23 é o iniciador Pat 5-3.

SEQ ID NO:24 é o iniciador Pat 3-3.

SEQ ID NO:25 é o iniciador directo *AAD-1 PTU*.

SEQ ID NO:26 é o iniciador inverso *AAD-1 PTU*.

SEQ ID NO:27 é o iniciador directo para PCR da região de codificação de AAD-1.

SEQ ID NO:28 é o iniciador inverso para PCR da região de codificação de AAD-1.

SEQ ID NO:29 é o nucleótido AAD-2 (v2) (otimizado para plantas).

SEQ ID NO:30 é a sequência traduzida da proteína AAD-2 (v2).

SEQ ID NO:31 é o fragmento "Southern" do iniciador directo de PCR AAD-1.

SEQ ID NO:32 é o fragmento "Southern" do iniciador inverso de PCR AAD-1.

Descrição detalhada do invento

O presente desenvolvimento de um gene de resistência a 2,4-D e subsequentes culturas resistentes proporciona excelentes opções para controlar espécies de ervas daninhas de folha larga, resistentes a glifosato (ou altamente tolerantes e com variação) para aplicações em cultura. O 2,4-D é um herbicida para folha larga de largo espectro, relativamente barato e robusto, que proporcionaria uma utilidade excelente para os produtores caso fosse possível proporcionar maior tolerância a culturas tanto de dicotiledóneas, como de outras monocotiledóneas. As culturas de dicotiledóneas transgênicas tolerantes a 2,4-D também teriam uma maior flexibilidade em termos de tempo e taxa de aplicação. Uma utilidade adicional de uma característica de tolerância a herbicida para 2,4-D seria a sua utilidade na prevenção de danos em culturas normalmente sensíveis devidos a arrastamento de 2,4-D, volatilização, inversão (ou outros fenómenos de movimentos externos), má aplicação, vandalismo e semelhantes. Um benefício adicional do gene AAD-1 é que, contrariamente a

todos os homólogos de *tfdA* caracterizados até à data, o AAD-1 é capaz de degradar os enantiómeros R (isómeros activos como herbicida) das fenoxiauxinas quirais (e.g., diclorprop e mecoprop) além das fenoxiauxinas aquirais (e.g., 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). Consultar a **tabela 1**. Foram utilizadas várias misturas de diferentes combinações de fenoxiauxina globalmente para atacar espectros específicos de ervas daninhas e condições ambientais em várias regiões. A utilização do gene *AAD-1* em plantas proporcionaria protecção contra um maior espectro de herbicidas fenoxiauxínicos, aumentando assim a flexibilidade e o espectro de ervas daninhas que pode ser controlado, protegendo de arrastamentos ou outras lesões externas dos herbicidas fenoxi para toda a gama de fenoxiauxinas disponíveis comercialmente.

Tabela 1. Fenoxiauxinas disponíveis comercialmente. A referência a herbicidas fenoxiauxínicos é feita em geral ao ácido activo, mas algumas são formuladas comercialmente como uma variedade de formulações dos ésteres correspondentes e estes são igualmente considerados como substratos para a enzima AAD-1 na planta, dado que em geral as esterases vegetais convertem estes ésteres nos ácidos activos na planta. Igualmente, também se pode referir o sal orgânico ou inorgânico correspondente do ácido correspondente. Quando se indicam herbicidas de ácido propiónico, sal ou éster quirais, as misturas racémicas (R,S) ou enantiómeros purificados opticamente (R ou S) são considerados os mesmos herbicidas para o objectivo de denominação destes herbicidas, embora possam corresponder números CAS diferentes aos compostos opticamente puros. As gamas de taxas de utilização possíveis podem ser como tratamentos sozinhos ou em combinação com outros herbicidas, tanto em utilizações em cultura como em não cultura.

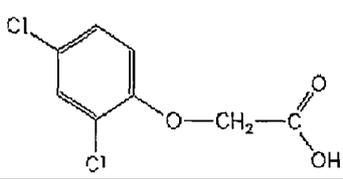
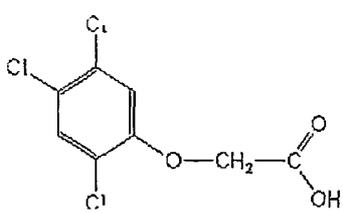
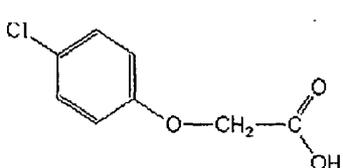
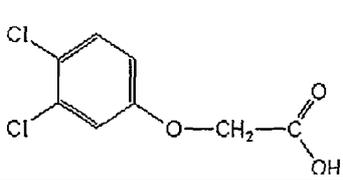
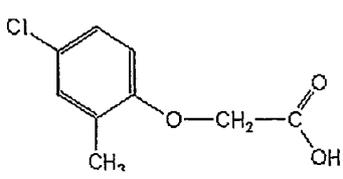
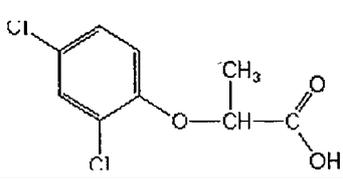
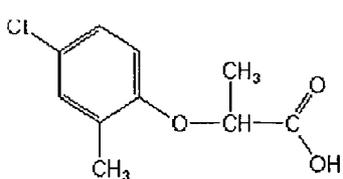
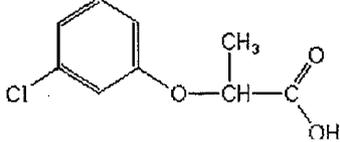
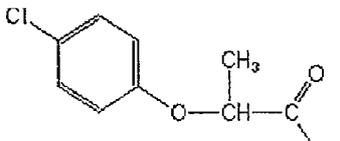
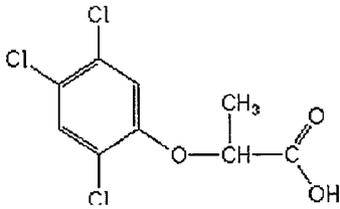
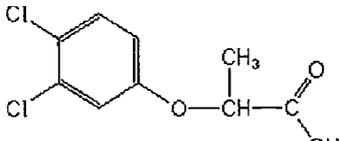
Tabela 1. Fenoxiauxinas disponíveis comercialmente.				
Nome químico	n.º CAS	Gamas de taxa de utilização possíveis (g ae/ha)	Gamas de taxa de utilização preferidas (g ae/ha)	Estrutura
2,4-D	94-75-7	25 - 4000	280 - 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 - 4000	25 - 4000	
4-CPA	122-88-3	25 - 4000	25 - 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 - 4000	25 - 4000	
MCPA	94-74-6	25 - 4000	125 - 1550	
Diclorprop	120-36-5	25 - 12000	100 - 2240	
Mecoprop	7085-19-0	25 - 4000	250 - 3360	

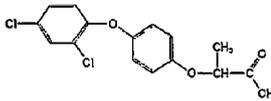
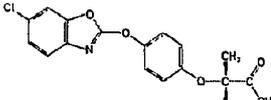
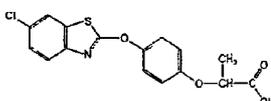
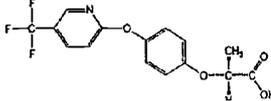
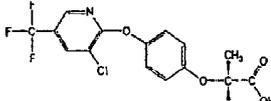
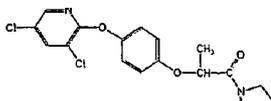
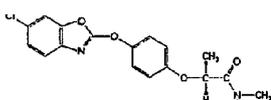
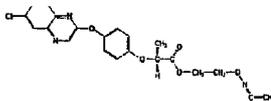
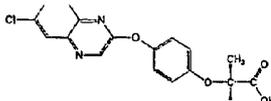
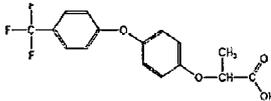
Tabela 1. Fenoxiauxinas disponíveis comercialmente.				
Nome químico	n.º CAS	Gamas de taxa de utilização possíveis (g ae/ha)	Gamas de taxa de utilização preferidas (g ae/ha)	Estrutura
Cloprop	101-10-0	25 - 4000	25 - 4000	
4-CPP	3307-39-9	25 - 4000	25 - 4000	
Fenoprop	93-72-1	25 - 4000	25 - 4000	
3,4-DP	3307-41-3	25 - 4000	25 - 4000	

Um benefício adicional do gene *AAD-1* é a sua capacidade sem precedentes de degradar concomitantemente uma gama de compostos graminicidas comerciais e não comerciais da classe geral dos ariloxifenoxipropionatos (AOPP). Consultar a **tabela 2**. Este atributo pode permitir a utilização de qualquer de vários compostos AOPP em culturas transgênicas contendo *AAD-1*, em que a tolerância dessas culturas não permitia anteriormente a utilização nessas culturas. Estas incluirão mais usualmente culturas de gramíneas tais como milho, arroz, trigo, cevada, centeio, aveia, sorgo, espécies de turfa de estação quente e de estação fria, espécies de pasto graminóide e muitas outras, mas também poderia incluir culturas de dicotiledóneas em que a tolerância a AOPP (presente naturalmente na maioria das dicotiledóneas) não atinge valores

comercialmente aceitáveis para permitir a utilização de AOPP nas referidas culturas de dicotiledóneas.

Tabela 2. Compostos graminicidas AOPP listados pelos nomes usualmente aceites. A referência a herbicidas AOPP é feita geralmente ao ácido activo, mas a maioria é formulada comercialmente como qualquer de várias formulações de ésteres e estes são igualmente considerados substratos para a enzima AAD-1 na plantas, dado que as esterases vegetais geralmente convertem estes ésteres nos ácidos activos na planta. Igualmente, a referência pode ser ao sal orgânico ou inorgânico correspondente do ácido correspondente. Quando se indicam herbicidas de ácido propiónico, sal ou éster quirais, as misturas racémicas (R,S) ou enantiómeros purificados opticamente (R ou S) são considerados os mesmos herbicidas para o objectivo de denominar estes herbicidas, embora possam corresponder números CAS diferentes aos compostos opticamente puros. As gamas de taxas de utilização possíveis podem ser como tratamentos sozinhos ou em combinação com outros herbicidas, tanto em utilizações em cultura como em não cultura.

Tabela 2. Compostos graminicidas AOPP listados pelos nomes usualmente aceites.				
Nome químico	n.º CAS	Gamas de taxa de utilização possíveis (g ae/ha)	Gamas de taxa de utilização preferidas (g ae/ha)	Estrutura
Clorazifop	72492-94-7	10-2000	10-2000	
Clodinafop	105512-06-9	10-2000	20-200	
Clofop	59621-49-7	10-2000	10-2000	
Ci-halofop	122008-85-9	10-2000	105-560	

Tabela 2. Compostos graminicidas AOPP listados pelos nomes usualmente aceites.				
Nome químico	n.º CAS	Gamas de taxa de utilização possíveis (g ae/ha)	Gamas de taxa de utilização preferidas (g ae/ha)	Estrutura
Diclofop	71283-65-3	10-2000	280-2000	
Fenoxaprop	66441-23-4	10-2000	20-200	
Fentiaprop	95721-12-3	10-2000	10-2000	
Fluazifop	69335-91-7	10-2000	25-420	
Haloxifop	69806-40-2	10-2000	20-600	
Isoxapirifop	87757-18-4	10-2000	30-240	
Metamifop	256412-89-2	10-2000	35-280	
Propaquizafop	111479-05-1	10-2000	30-240	
Quizalofop	76578-14-8	10-2000	20-240	
Trifop	58597-74-4	10-2000	10-2000	

Identificou-se agora um único gene (*AAD-1*) que, quando modificado por engenharia genética para expressão em plantas, tem as propriedades que permitem a utilização de herbicidas fenoxiauxínicos em plantas em que nunca existiu tolerância inerente ou em que esta não era suficientemente elevada para permitir a utilização destes herbicidas. Adicionalmente, o *AAD-1* pode proporcionar protecção na planta contra herbicidas AOPP quando a tolerância natural também não era suficiente para permitir selectividade. As plantas contendo apenas *AAD-1* podem ser agora tratadas sequencialmente ou misturadas em tanque com um, dois ou uma combinação de vários herbicidas fenoxiauxínicos. A taxa para cada herbicida fenoxiauxínico pode estar na gama de 25 a 4000 g ae/ha e mais tipicamente de 100 a 2000 g ae/ha para o controlo de um vasto espectro de ervas daninhas dicotiledóneas. Igualmente podem ser aplicados um, dois ou uma mistura de vários compostos graminicidas AOPP às plantas que expressam *AAD-1* com risco reduzido de lesões pelos referidos herbicidas. A taxa para cada AOPP pode estar na gama de 10 a 2000 g ae/ha e mais tipicamente 20-500 g ae/ha para o controlo de um vasto espectro de ervas daninhas monocotiledóneas. As combinações destas diferentes classes químicas e de herbicidas com modos e espectros de acção diferentes no mesmo campo (quer sequencialmente, quer em combinação por mistura em tanque) deve proporcionar controlo da maioria das ervas daninhas potenciais para as quais se pretende controlo com herbicida.

O glifosato é utilizado extensivamente porque controla um muito vasto espectro de ervas daninhas de folha larga e gramíneas. No entanto, a utilização repetida de glifosato em GTC e em aplicações fora de cultura tem seleccionado, e continuará a seleccionar, variações de ervas daninhas para espécies naturalmente mais tolerantes ou biotipos resistentes a glifosato. A mistura de parceiros herbicidas em tanque utilizados em taxas eficazes que proporcionam controlo da mesma espécie mas que têm diferentes modos de acção é prescrito pela maioria das estratégias de gestão de resistência a herbicida como um método para atrasar o aparecimento de ervas daninhas resistentes. A junção de *AAD-1*

com uma característica de tolerância a glifosato (e/ou com outras características de tolerância a herbicidas) pode proporcionar um mecanismo para permitir o controlo de espécies de ervas daninhas resistentes a glifosato (quer espécies de gramíneas com um ou mais herbicidas AOPP, quer espécies de ervas daninhas de folha larga com uma ou mais fenoxiauxinas) em GTC, permitindo a utilização de herbicida(s) glifosato, fenoxiauxina(s) (e.g., 2,4-D) e AOPP (e.g., quizalofop) selectivamente na mesma cultura. As aplicações destes herbicidas poderiam ser simultâneas numa mistura em tanque compreendendo dois ou mais herbicidas de diferentes modos de acção; aplicações individuais de composição de um único herbicida em aplicações sequenciais como pré-plantio, pré-emergência ou pós-emergência e desdobramento dos intervalos de aplicações desde 2 horas a 3 meses; ou alternativamente pode aplicar-se qualquer combinação de qualquer número de herbicidas representativos de cada classe química em qualquer altura no intervalo de 7 meses do plantio da cultura até à colheita da cultura (ou o intervalo pré-colheita para o herbicida individual, dependendo do que for mais curto).

É importante ter flexibilidade no controlo de um vasto espectro de ervas daninhas gramíneas e de folha larga em termos de altura de aplicação, taxa de herbicidas individuais e capacidade para controlar ervas daninhas difíceis ou resistentes. As aplicações de glifosato numa cultura com uma junção do gene de resistência a glifosato/*AAD-1* pode estar na gama de 250-2500 g ae/ha; o(s) herbicida(s) fenoxiauxínico(s) (um ou mais) poderiam ser aplicados a 25-4000 g ae/ha; e o(s) herbicida(s) AOPP (um ou mais) poderiam ser aplicados a 10-2000 g ae/ha. A(s) combinação(ões) óptima(s) e altura desta(s) aplicação(ões) dependerão da situação específica, espécie e ambiente e serão determinadas da melhor forma por um perito na especialidade do controlo de ervas daninhas e com o benefício da presente divulgação.

As formulações de herbicida (e.g., formulação em éster, ácido ou sal; ou concentrado solúvel, concentrado emulsionável ou líquido solúvel) e os aditivos da mistura em tanque (e.g.,

adjuvantes ou agentes de compatibilidade) podem afectar significativamente o controlo de ervas daninhas de um determinado herbicida ou combinação de um ou mais herbicidas. Qualquer combinação destes com qualquer um dos produtos químicos herbicidas mencionados anteriormente encontra-se no âmbito deste invento.

Um perito na especialidade também perceberia o benefício de combinar dois ou mais modos de acção para aumentar o espectro de ervas daninhas controladas e/ou para o controlo de espécies naturalmente mais tolerantes ou espécies de ervas daninhas resistentes poder-se-ia também alargar a grupos químicos para os quais a tolerância a herbicida foi permitida em culturas por envolvimento humano (quer transgénica, quer não transgenicamente) além das GTC. De facto, podem juntar-se características que codificam resistência a glifosato (e.g., *EPSPS*, *GOX*, *GAT* de plantas ou bactérias resistentes), resistência a glufosinato (e.g., *Pat*, *bar*), resistência a herbicida que inibe acetolactato-sintetase (ALS) (e.g., imidazolinona, sulfonilureia, triazolopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltiobenzoatos e outros grupos químicos = *AHAS*, *Csrl*, *SurA*, et al.), resistência a bromoxinil (e.g., *Bxn*), resistência a inibidores de enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase), resistência a inibidores de fitoenodessaturase (PDS), resistência a herbicidas que inibem o fotossistema II (e.g., *psbA*), resistência a herbicidas que inibem o fotossistema I, resistência a herbicidas que inibem protoporfirinogénio-oxidase IX (PPO) (e.g., *PPO-1*), resistência a herbicidas de fenilureia (e.g., *CYP76B1*), enzimas de degradação de dicamba (consultar, e.g., US 20030135879) e outros, sozinhos ou em combinações múltiplas, para proporcionar a capacidade de controlar ou evitar eficazmente as variações das ervas daninhas e/ou resistência a qualquer herbicida das classes supramencionadas.

Relativamente a herbicidas adicionais, alguns inibidores de ALS adicionais preferidos incluem as triazolopirimidinassulfonanilidas (tais como cloransulam-metilo, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam e

penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (tais como bispiribac e piritiobac) e flucarbazona. Alguns dos inibidores de HPPD preferidos incluem mesotriona, isoxaflutola e sulcotriona. Alguns inibidores de PPO preferidos incluem flumiclorac, flumioxazina, flufenpir, piraflufen, flutiacet, butafenacil, carfentrazona, sulfentrazona e os difeniléteres (tais como acifluorfen, fomesafen, lactofen e oxifluorfen).

Adicionalmente, o AAD-1 sozinho ou junto com uma ou mais características de HTC adicionais podem ser juntos com uma ou mais características iniciais (e.g., resistência a insectos, resistência a fungos ou tolerância a stress, *et al.*) ou finais (e.g., rendimento aumentado, melhor perfil de óleos, melhor qualidade de fibra, *et al.*) adicionais. Assim, o presente invento pode ser utilizado para proporcionar um pacote agronómico completo de qualidade de cultura melhorada com a capacidade de controlar flexivelmente e com um custo eficaz quaisquer pestes agronómicas.

Descreve-se a identificação de uma enzima que não só é capaz de degradar 2,4-D, mas surpreendentemente também possui novas propriedades, que distinguem a enzima das proteínas *tfdA* previamente conhecidas, por exemplo. Embora esta enzima tenha muito baixa homologia com *tfdA*, os genes utilizados ainda podem ser na generalidade classificados na mesma família global de dioxigenases dependentes de α -cetogluturato. Esta família de proteínas é caracterizada por três resíduos de histidina conservados num motivo "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" que compreende o local activo. As histidinas coordenam o ião Fe^{+2} no local activo que é essencial para a actividade catalítica (Hogan *et al.*, 2000). As experiências preliminares de expressão *in vitro* aqui discutidas foram concebidas para auxiliar a seleccionar novos atributos.

Mais especificamente, o presente invento refere-se em parte à utilização de uma enzima que não só é capaz de degradar 2,4-D, mas também herbicidas AOPP. Não foi reportada anteriormente qualquer enzima dioxigenase dependente de α -cetogluturato que tenha a capacidade de degradar herbicidas

de classes químicas e modos de acção diferentes. As enzimas e genes preferidos para utilização de acordo com o presente invento são aqui denominados genes e proteínas AAD-1 (ArioxiAlcanoato-Dioxigenase).

Também se descreve a identificação e utilização de genes que codificam enzimas ariloxialcanoato-dioxigenase que são capazes de degradar herbicidas fenoxiauxínicos e ariloxifenoxipropionato, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, outros herbicidas auxínicos fenoxialcanóicos e herbicidas ariloxifenoxialcanoatos por uma enzima AAD-1 expressa recombinantemente.

As proteínas têm ensaio positivo para conversão de 2,4-D em 2,4-Diclorofenol ("DCP"; inactivo como herbicida) em ensaios analíticos e biológicos. As proteínas parcialmente purificadas do presente invento podem converter rapidamente 2,4-D em DCP (na gama de 50-100% de conversão) *in vitro*. Uma vantagem adicional que as plantas transformadas com AAD-1 proporcionam é que o(s) herbicida(s) parental(is) é(são) metabolizado(s) em formas inactivas, reduzindo assim o potencial para colheita de resíduos de herbicida no grão ou restolho.

O presente invento inclui métodos para controlar ervas daninhas em que os referidos métodos compreendem a aplicação de um herbicida AOPP e/ou um herbicida fenoxiauxínico em plantas compreendendo um gene AAD-1.

Em vista destas constatações, proporcionam-se agora novas plantas que compreendem um polinucleótido que codifica este tipo de enzima. Até ao momento, não existia qualquer motivação para produzir tais plantas e não existia qualquer expectativa de que tais plantas pudessem produzir eficazmente esta enzima para tornar as plantas resistentes não só a herbicidas de ácidos fenoxi (tais como 2,4-D) mas também herbicidas AOPP. Assim, o presente invento proporciona muitas vantagens que até agora não se pensava serem possíveis na especialidade.

Podem adquirir-se e rastrear-se estirpes disponíveis ao público (depositadas em colecções de culturas tais como ATCC ou DSMZ), utilizando técnicas aqui divulgadas, quanto a novos genes. As sequências aqui divulgadas podem ser utilizadas para amplificar e clonar genes homólogos num sistema de expressão recombinante para rastreio e ensaios adicionais, de acordo com o presente invento.

Tal como discutido anteriormente na secção de antecedentes, um organismo que foi extensivamente estudado relativamente à sua capacidade de degradar 2,4-D é *Ralstonia eutropha* (Streber et al., 1987). O gene que codifica a primeira enzima na via de degradação é *tfdA*. Consultar patente U.S. 6 153 401 e N.º de acesso GENBANK M16730. O *tfdA* catalisa a conversão de ácido 2,4-D em DCP inactivo como herbicida através de uma reacção pela dioxigenase dependente de α -cetogluturato (Smejkal et al., 2001). O *tfdA* tem sido utilizado em plantas transgénicas para conferir resistência a 2,4-D em plantas dicotiledóneas (e.g., algodão e tabaco) normalmente sensíveis a 2,4-D (Streber et al., 1989; Lyon et al., 1989; Lyon et al., 1993). Foi identificado do ambiente um elevado número de genes do tipo *tfdA* que codificam proteínas capazes de degradar 2,4-D e foram depositadas no banco de dados Genbank. Muitos homólogos são bastante semelhantes a *tfdA* (>85% de identidade de aminoácidos) e têm propriedades enzimáticas semelhantes a *tfdA*. No entanto, foi presentemente identificada uma pequena colecção de homólogos de dioxigenase dependente de α -cetogluturato que têm um baixo nível de homologia com *tfdA*.

RdpA de *Shingobium herbicidovorans* (Westendorf et al., 2002) é um exemplo único com baixa homologia (28% de identidade de aminoácidos). Demonstrou-se que esta enzima catalisa a primeira etapa da mineralização de (R)-diclorprop (e outros ácidos (R)-fenoxipropiónicos), bem como de 2,4-D (um ácido fenoxiacético) (Westendorf et al., 2003). Embora o organismo responsável pela degradação de ácido fenoxipropiónico seja conhecido há algum tempo, têm sido feitos poucos progressos na caracterização desta via até

recentemente (Horvath *et al.*, 1990). Uma complicação adicional na degradação de diclorprop é a estereoespecificidade (R vs. S) envolvida tanto na absorção (Kohler, 1999), como na oxidação inicial de diclorprop (Westendorf *et al.*, 2003). Ainda não foi relatada a expressão heteróloga de *rdpA* noutros micróbios ou a transformação deste gene em plantas. A literatura tem-se focado principalmente em torno de homólogos próximos de *tfdA* que degradam principalmente ácidos fenoxiacéticos aquirais. Não existia qualquer expectativa anterior de que os genes *rdpA* ou *AAD-1* pudessem ser expressos com sucesso em plantas, de modo a tornar as plantas resistentes a 2,4-D (sem mencionar a completamente surpreendente resistência a AOPP).

Tal como descrito mais detalhadamente nos exemplos seguintes, o *rdpA* foi clonado de *Sphingobium herbicidovorans* e ensaiado quanto a promiscuidade de substrato entre várias classes químicas de herbicidas. Tinha-se demonstrado anteriormente que esta enzima dioxigenase dependente de α -cetoglutarato purificada na sua forma nativa degrada 2,4-D e diclorprop (Westendorf *et al.*, 2002 e 2003). No entanto, não se tinha relatado anteriormente que qualquer enzima dioxigenase dependente de α -cetoglutarato tivesse a capacidade de degradar herbicidas de diferentes classes químicas e modos de acção. O *rdpA* nunca tinha sido expresso em plantas, nem existia qualquer motivação para o fazer porque o desenvolvimento de novas tecnologias de HTC tem sido limitado largamente devido à eficácia, baixo custo e conveniência das GTC (Devine, 2005).

Tendo em consideração a nova actividade, as proteínas e genes do presente invento denominam-se aqui proteínas e genes AAD-1. Presentemente confirmou-se que AAD-1 degrada uma variedade de herbicidas auxínicos fenoxiacéticos e fenoxipropiónicos *in vitro*. No entanto, tal como relatado pela primeira vez aqui, verificou-se surpreendentemente que esta enzima também é capaz de degradar substratos adicionais da classe das moléculas de ariloxialcanoato. Os substratos com importância agronómica significativa são os herbicidas de

gramíneas ariloxifenoxipropionatos (AOPP). Esta divulgação altamente inovadora é a base das oportunidades de características de culturas tolerantes a herbicidas (HTC) e marcadores seleccionáveis.

Relata-se aqui o vasto espectro de herbicidas AOPP para gramíneas que são substratos excelentes para AAD-1, bem como 2,4-D, diclorprop e outras fenoxiauxinas. Esta enzima é única na sua capacidade de apresentar actividade de degradação de herbicidas contra uma gama de herbicidas de largo espectro para folha larga (fenoxiauxinas) e uma gama de herbicidas de largo espectro para gramíneas altamente activos (AOPP).

Assim, o presente invento refere-se em parte à degradação do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, outros herbicidas auxínicos fenoxialcanóicos e herbicidas ariloxifenoxialcanoatos através de uma enzima ariloxialcanoato-dioxigenase (AAD-1) expressa recombinantemente. Também se divulga a identificação e utilizações de genes que codificam uma enzima de degradação ariloxialcanoato-dioxigenase (AAD-1) capaz de degradar herbicidas fenoxiauxínicos e ariloxifenoxipropionatos.

A enzima permite expressão transgénica resultante em tolerância a combinações de herbicidas que controlariam praticamente todas as ervas daninhas de folha larga e gramíneas. AAD-1 pode servir como uma excelente característica de cultura tolerante a herbicida (HTC) para juntar a outras características de HTC (e.g., resistência a glifosato, resistência a glufosinato, resistência a imidazolinona, resistência a bromoxinil, et al.) e características de resistência a insectos (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, et al.) por exemplo. Adicionalmente, o AAD-1 pode servir como um marcador seleccionável para auxílio na selecção de produtos de transformação primários de plantas modificadas por engenharia genética com um segundo gene ou grupo de genes.

Além disso, o gene microbiano foi re-manipulado de modo que a proteína é codificada por codões com um desvio para utilização em plantas monocotiledóneas e dicotiledóneas

(hemicotiledóneas). Transformaram-se *Arabidopsis*, milho, tabaco, algodão, soja, colza e arroz com construções contendo AAD-1 e demonstraram-se elevados níveis de resistência tanto a fenoxiauxina, como a herbicidas AOPP. Tal como apresentado seguidamente no exemplo 6, o gene reconstruído exemplificado foi mais eficaz a conferir resistência a herbicida à planta, comparativamente com o gene bacteriano.

Os grupos oxialcanoato são úteis para introduzir uma funcionalidade ácida estável em herbicidas. O grupo ácido pode conferir mobilidade de floema por "captura ácida", que é um atributo desejável para acção herbicida e portanto poderia ser incorporado em novos herbicidas com objectivos de mobilidade. Aspectos do presente invento também proporcionam um mecanismo para criar HTC. Existem muitos herbicidas comerciais e experimentais potenciais que podem servir como substratos para AAD-1. Assim, a utilização dos presentes genes pode também resultar em tolerância a herbicida igualmente a estes outros herbicidas.

As características de HTC do presente invento podem ser utilizadas em novas combinações com outras características de HTC (incluindo entre outras tolerância a glifosato). Estas combinações de características dão origem a novos métodos para controlar espécies de ervas daninhas (e semelhantes), devido à resistência assim adquirida ou à tolerância inerente a herbicidas (e.g., glifosato). Assim, além das características de HTC, os novos métodos para controlar ervas daninhas utilizando herbicidas, para os quais se criou tolerância a herbicida através da referida enzima em culturas transgênicas, encontram-se no âmbito do invento.

Adicionalmente, as culturas tolerantes a glifosato cultivadas em todo o mundo são prevalecentes. Muitas vezes em rotação com outras culturas tolerantes a glifosato, o controlo de voluntários resistentes a glifosato pode ser difícil em culturas em rotação. Assim, a utilização das presentes características transgênicas, transformadas em conjunto ou

individualmente em culturas, proporciona uma ferramenta para controlar outras culturas HTC voluntárias.

Este invento pode ser aplicado no contexto da comercialização de uma característica de resistência a 2,4-D em conjunto com as características actuais de resistência a glifosato em soja, por exemplo. Assim, este invento proporciona uma ferramenta para combater variações de espécies de ervas daninhas de folha larga e/ou selecção de ervas daninhas de folha larga resistentes a herbicida, que culmina da extremamente elevada confiança dos produtores no glifosato para controlo de ervas daninhas em várias culturas.

Exemplifica-se a expressão transgénica dos presentes genes *AAD-1* em, por exemplo, *Arabidopsis*, milho, tabaco, algodão, arroz, soja e colza. No entanto, o presente invento pode ser aplicado a quaisquer outros tipos desejáveis de plantas. A soja é uma cultura preferida para transformação de acordo com o presente invento. No entanto, este invento pode ser aplicado a múltiplas outras culturas de gramíneas e outras culturas de folha larga. De igual modo, o 2,4-D pode ser utilizado mais positivamente em culturas de gramíneas em que a tolerância a 2,4-D é moderada e uma tolerância aumentada através desta característica proporcionaria aos produtores a oportunidade de utilizar 2,4-D em taxas mais eficazes e ao longo de um período de aplicação mais alargado, sem o risco de lesões na cultura.

Ainda adicionalmente, o presente invento utiliza um único gene que pode proporcionar resistência a herbicidas que controlam ervas daninhas de folha larga (auxinas) e gramíneas (AOPP). Este gene pode ser utilizado em múltiplas culturas para permitir a utilização de um vasto espectro de combinações de herbicidas. O presente invento pode também controlar ervas daninhas resistentes a produtos químicos actuais e auxiliar no controlo de variações do espectro de ervas daninhas resultantes das práticas agronómicas actuais. O presente *AAD-1* pode também ser utilizado em esforços para desintoxicar eficazmente substratos herbicidas adicionais em formas não herbicidas. Assim, o presente invento proporciona o

desenvolvimento de características de HTC adicionais e/ou tecnologia de marcadores seleccionáveis.

Independentemente ou em adição à utilização dos presentes genes para produzir HTC, os presentes genes podem também ser utilizados como marcadores seleccionáveis para seleccionar com sucesso produtos de transformação em culturas celulares, estufas e no campo. Há um elevado valor inerente para os presentes genes simplesmente como marcadores seleccionáveis para projectos de biotecnologia. A promiscuidade de AAD-1 para outros herbicidas auxínicos fenoxialcanóicos proporciona muitas oportunidades para utilizar este gene para objectivos de HTC e/ou de marcador seleccionável.

Um gene, aqui denominado AAD-1 (ariloxialcanoato-dioxigenase), foi clonado a partir de *Sphingobium herbicidovorans* (ATCC 700291) por PCR em pET 280-S/S (denominado pDAB 3203) e expresso em *E. coli* BL-21 Star. Quando este gene é sobre-expresso (por indução com IPTG 1 mM) e o lisado da cultura é combinado com a seguinte mistura reaccional: 2,4-D a 112,5 µg/ml, ácido ascórbico 1 mM, α-cetoglutarato 1 mM, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 50 µM, a enzima produzida recombinantemente degrada 2,4-D em DCP inactivo como herbicida (tal como determinado por HPLC, espectrometria de massa, ensaio colorimétrico e ensaio de placas de *Arabidopsis*). Adicionalmente, demonstrou-se que AAD-1 converte os seguintes herbicidas no seu fenol correspondente inactivo: diclorprop, mecoprop, haloxifop, diclofop e outros (consultar as **tabelas 3 e 4**).

Tabela 3: Efeito de AAD-1 (v1) purificado em vários herbicidas auxínicos e análogos de auxina. Os substratos foram ensaiados a 1 mM em MOPS 25 mM pH 6,8, Fe^{2+} 200 μM , ascorbato de Na 200 μM , α -cetoglutarato 1 mM, utilizando 1 μg ou 10 μg (10X) de AAD-1 (v1) purificado por 0,16 ml de ensaio.

Tabela 3: Efeito de AAD-1 (v1) purificado em vários herbicidas auxínicos e análogos de auxina.

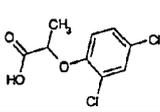
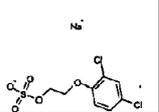
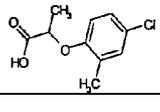
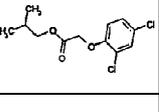
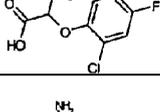
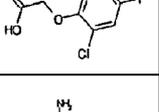
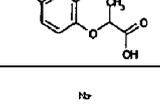
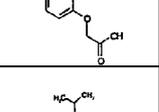
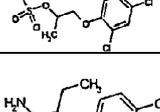
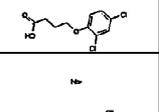
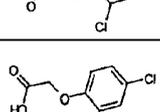
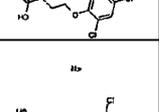
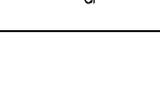
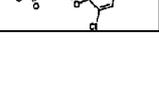
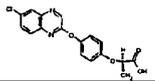
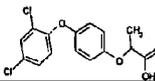
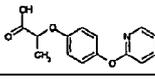
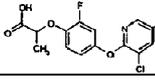
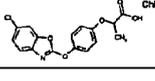
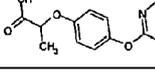
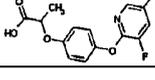
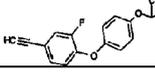
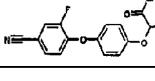
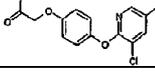
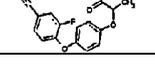
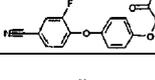
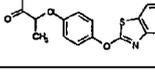
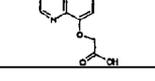
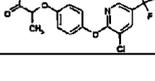
ESTRUTURA	ID de registo	Composto	AAD1	AAD1 (10x)	ESTRUTURA	ID de registo	Composto	AAD1	AAD1 (10x)
	117613	(R,S)-dicloroprop	0,566	2,594		398166	sesona	0,02	0,177
	188874	(R,S)-mecoprop	0,341	2,085		190252		0,008	0,211
	83293	(R,S)-2-cloro,4-fluorofenoxi-propionato	0,304	2,358		124988		0,007	0,058
	11113675	(R,S)-3-aminodicloroprop	0,228	2,676		11263526		0,004	0,069
	188476		0,077	0,687		178577		0,003	0,021
	192132		0,064	0,204		178587		0,003	0,02
	195517	2,4-D	0,034	0,383		188527		0,003	0,036

Tabela 4: Efeito de AAD-1 (v1) purificado em vários graminicidas AOPP e análogos e em cloquintocet. Os substratos foram ensaiados a 1 mM em MOPS 25 mM, pH 6,8, Fe²⁺ 200 µM, ascorbato de Na 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM utilizando 1 µg ou 10 µg (10X) de AAD-1 (v1) purificado por 0,16 ml de ensaio.

Tabela 4. Efeito de AAD-1 (v1) purificado em vários graminicidas AOPP e análogos e em cloquintocet.									
ESTRUTURA	ID de registo	Composto	AAD1	AAD1 (10x)	ESTRUTURA	ID de registo	Composto	AAD1	AAD1 (10x)
	18706	(R)-quizalofop	0,43	2,1		460511	(R,S)-diclofop	0,155	1,663
	67131	(R,S)-fluzazifop	0,427	2,17		25646	(R,S)-clorazifop	0,144	1,69
	11044492	(R)-fenoxaprop	0,408	0,597		70222	(R,S)-clorazifop	0,128	1,584
	34697	(R,S)-clodinfop	0,295	1,98		199608	ci-halofop	0,114	1,26
	14603	(R)-ci-halofop	0,222	1,989		43865	haloxifop-oxiacetato	0,004	0,053
	14623	(R,S)-ci-halofop	0,215	1,815		7466	(S)-ci-halofop	0,003	0,017
	62942	(R,S)-fentiaprop	0,199	1,055		204558	Cloquintocet	0	0,001
	66905	haloxifop	0,172	1,63					

Proteínas (e isolados de fonte). O presente invento utiliza proteínas funcionais. "Actividade funcional" (ou "activa") significa aqui que as proteínas/enzimas para utilização de acordo com o presente invento têm a capacidade de degradar ou diminuir a actividade de um herbicida (sozinhas ou em combinação com outras proteínas). As plantas que produzem proteínas do presente invento de preferência produzirão "uma quantidade eficaz" da proteína de modo a que, quando a planta é tratada com um herbicida, o nível de expressão da proteína é suficiente para tornar a planta completa ou parcialmente resistente ou tolerante ao herbicida

(a uma taxa típica, salvo indicação em contrário; as taxas de aplicação típicas podem ser encontradas no bem conhecido *Herbicide Handbook* (Weed Science Society of America, Oitava edição, 2002), por exemplo). O herbicida pode ser aplicado em taxas que normalmente matariam a planta alvo, em taxas e concentrações de campo normais. (Devido ao presente invento, o nível e/ou concentração podem ser opcionalmente superiores aos que foram previamente utilizados.) De preferência, as células vegetais e plantas do presente invento estão protegidas contra inibição de crescimento ou lesões causadas por tratamento com herbicida. As plantas e células vegetais transformadas do presente invento tornam-se de preferência resistentes ou tolerantes a um herbicida, tal como aqui discutido, o que significa que a planta ou células vegetais transformadas podem crescer na presença de quantidades eficazes de um ou mais herbicidas, tal como aqui discutido. As proteínas preferidas do presente invento têm actividade catalítica para metabolizar um ou mais compostos ariloxialcanoato.

A transferência da actividade funcional para plantas ou sistemas bacterianos pode envolver uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos para uma proteína integrada num vector de expressão da proteína adequado ao hospedeiro onde se irá encontrar o vector. Uma forma de obter uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína com actividade funcional é isolar o material genético nativo das espécies bacterianas que produzem a proteína de interesse, utilizando a informação deduzida da sequência de aminoácidos da proteína, tal como aqui divulgada. As sequências nativas podem ser optimizadas para expressão em plantas, por exemplo, tal como discutido seguidamente em maior detalhe. Também se pode conceber um polinucleótido optimizado com base na sequência da proteína.

O presente invento utiliza classes de proteínas com novas actividades, tal como aqui identificadas. Um modo de caracterizar estas classes de proteínas e os polinucleótidos que as codificam é definindo um polinucleótido pela sua capacidade de hibridar, numa gama de condições especificadas,

com uma sequência de nucleótidos exemplificada (o seu complementar e/ou uma sonda ou sondas derivadas de qualquer das cadeias) e/ou a sua capacidade de ser amplificado por PCR utilizando iniciadores derivados das sequências exemplificadas.

Existem muitos métodos para obter proteínas para utilização de acordo com o presente invento. Por exemplo, podem utilizar-se anticorpos para as proteínas aqui divulgadas para identificar e isolar outras proteínas de uma mistura de proteínas. Especificamente podem desenvolver-se anticorpos para partes das proteínas que são mais conservadas ou mais distintas comparativamente com outras proteínas relacionadas. Estes anticorpos podem então ser utilizados para identificar especificamente proteínas equivalentes com a actividade característica por imunoprecipitação, ensaio de imuno-absorção enzimática (ELISA) ou imunotransferência. Podem preparar-se facilmente anticorpos para as proteínas aqui divulgadas ou para proteínas equivalentes ou para fragmentos destas proteínas, utilizando procedimentos padrão. Os anticorpos incluem anticorpos monoclonais e policlonais, de preferência produzidos em resposta a uma proteína exemplificada ou sugerida.

Um perito na especialidade reconhecerá facilmente que as proteínas (e genes) do presente invento podem ser obtidas de uma variedade de fontes. Dado que se sabe que os operões de degradação completa de herbicidas são codificados em elementos transponíveis tais como plasmídeos, bem como integrados genomicamente, podem obter-se proteínas do presente invento a partir de uma vasta variedade de microrganismos, por exemplo, incluindo bactérias recombinantes e/ou de tipo selvagem. Podem ser utilizados como isolados fonte outros membros das ordens Firmicutes e Proteobacteria e géneros específicos com *rdpA* conhecidos, tais como *Sphingobium*, *Delftia*, *Rodoferrax* e *Comamonas*, por exemplo.

Podem preparar-se mutantes de isolados bacterianos por procedimentos que são bem conhecidos na especialidade. Por

exemplo, podem obter-se mutantes não esporogénicos através de mutagénese de um isolado com etilmetanossulfonato (EMS). Os mutantes podem ser preparados utilizando luz ultravioleta e nitrosoguanidina por procedimentos bem conhecidos na especialidade.

Uma proteína "de" ou "obtenível de" qualquer dos presentes isolados aqui nomeada ou sugerida significa que a proteína (ou uma proteína semelhante) pode ser obtida do isolado ou de alguma outra fonte, tal como outra estirpe bacteriana ou uma planta. "Derivada de" também tem esta conotação e inclui proteínas obteníveis de um determinado tipo de bactéria que são modificadas para expressão numa planta, por exemplo. Um perito na especialidade reconhecerá facilmente que, dada a divulgação de um gene e proteína bacterianos, pode conceber-se racionalmente uma planta para produzir a proteína. Podem preparar-se preparações de anticorpo, sondas de ácido nucleico (ADN, ARN ou PNA, por exemplo) e semelhantes, utilizando o polinucleótido e/ou as sequências de aminoácidos aqui divulgadas e utilizadas para rastrear e recuperar outros genes relacionados de outras fontes (naturais).

Podem utilizar-se técnicas padrão de biologia molecular para clonar e sequenciar as proteínas e genes aqui descritos. Pode encontrar-se informação adicional em Sambrook *et al.*, 1989.

Polinucleótidos e sondas. Proporcionam-se adicionalmente sequências de nucleótidos que codificam proteínas para utilização de acordo com o presente invento. O presente invento proporciona adicionalmente métodos para identificar e caracterizar genes que codificam proteínas com a actividade herbicida pretendida. Numa concretização, o presente invento proporciona sequências de nucleótidos únicas que são úteis como sondas e/ou iniciadores de hibridação para técnicas de PCR. Os iniciadores produzem fragmentos de genes característicos que podem ser utilizados na identificação, caracterização e/ou isolamento de genes de interesse específicos. As sequências de nucleótidos do presente invento

codificam proteínas que são distintas das proteínas anteriormente descritas.

Os polinucleótidos podem ser utilizados para formar "genes" completos para codificar proteínas ou péptidos numa célula hospedeira pretendida. Por exemplo, tal como o perito na especialidade reconhecerá facilmente, os presentes polinucleótidos podem ser colocados adequadamente sob controlo de um promotor num hospedeiro de interesse, tal como é bem conhecido na especialidade. O nível de expressão génica e expressão específica do momento/do tecido pode ter um grande impacto na utilidade do invento. Em geral, os maiores níveis de expressão de um gene de degradação resultam numa degradação mais rápida e mais completa de um substrato (neste caso de um herbicida alvo). Será desejável que os promotores expressem o gene alvo em níveis elevados, salvo se a expressão elevada tiver um conseqüente impacto negativo na saúde da planta. Tipicamente seria desejável que o gene *AAD-1* fosse expresso constitutivamente em todos os tecidos para protecção completa da planta, em todos os estádios do crescimento. No entanto, poder-se-ia alternativamente utilizar um gene de resistência expresso vegetativamente; tal permitiria a utilização do herbicida alvo na cultura para controlo de ervas daninhas e controlaria subseqüentemente a reprodução sexuada da cultura alvo por aplicação durante o estágio de floração.

Tal como é sabido pelos peritos na especialidade, o ADN existe tipicamente numa forma em cadeia dupla. Neste arranjo, uma cadeia é complementar à outra e vice-versa. À medida que o ADN é replicado numa planta (por exemplo), são produzidas cadeias complementares de ADN adicionais. A "cadeia codificante" é frequentemente utilizada na especialidade para referir a cadeia que se liga à cadeia anti-sentido. O ARNm é transcrito a partir da cadeia "anti-sentido" do ADN. A cadeia de "sentido directo" ou "codificante" tem uma série de codões (um codão é um conjunto de três nucleótidos que pode ser lido como uma unidade de três resíduos para especificar um determinado aminoácido) que pode ser lido como um quadro de leitura aberto (ORF) para formar uma proteína ou péptido de

interesse. De modo a produzir uma proteína *in vivo*, tipicamente uma cadeia de ADN é transcrita numa cadeia complementar de ARNm, que é utilizado como molde para a proteína. Assim, o presente invento inclui a utilização dos polinucleótidos exemplificados apresentados na listagem de sequências em anexo e/ou equivalentes, incluindo as cadeias complementares. Incluem-se no presente invento ARN e PNA (ácido nucleico peptídico) que são funcionalmente equivalentes às moléculas de ADN exemplificadas.

Podem cultivar-se isolados bacterianos em condições que resultam em elevada multiplicação do micróbio. Após tratamento do micróbio para obter ácido nucleico genómico em cadeia simples, pode pôr-se o ADN em contacto com os iniciadores do invento e sujeitar-se a amplificação por PCR. Os fragmentos característicos dos genes de interesse serão amplificados pelo procedimento, identificando assim a presença do(s) gene(s) de interesse.

Aspectos adicionais incluem genes e isolados identificados utilizando os métodos e as sequências de nucleótidos aqui divulgadas. Os genes assim identificados podem codificar proteínas de resistência a herbicidas do presente invento.

As proteínas e genes para utilização de acordo com o presente invento podem ser identificados e obtidos por utilização de sondas oligonucleotídicas, por exemplo. Estas sondas são sequências de nucleótidos detectáveis que podem ser detectadas devido a um marcador adequado ou podem tornar-se inerentemente fluorescentes, tal como descrito no pedido internacional WO 93/16094. As sondas (e os polinucleótidos do presente invento) podem ser ADN, ARN ou PNA. Além de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) e uracilo (U; para moléculas de ARN), as sondas sintéticas (e polinucleótidos) do presente invento podem também ter inosina (uma base neutra capaz de emparelhar com todas as quatro bases; por vezes utilizada em vez de uma mistura de todas as quatro bases em sondas sintéticas) e/ou outras bases sintéticas (não naturais). Assim, quando aqui se refere um

oligonucleótido sintético degenerado e é utilizado genericamente "N" ou "n", "N" ou "n" pode ser G, A, T, C ou inosina. Os códigos de ambiguidade tal como aqui utilizados estão de acordo com as convenções de nomenclatura padrão da IUPAC da altura da apresentação do presente pedido (por exemplo, R significa A ou G, Y significa C ou T, etc.).

Tal como é bem conhecido na especialidade, caso uma molécula sonda hibride com uma amostra de ácido nucleico, pode assumir-se razoavelmente que a sonda e a amostra têm homologia/similaridade/identidade substancial. De preferência, é primeiro efectuada a hibridação do polinucleótido, seguida por lavagens em condições de rigor baixo, moderado ou alto, por técnicas bem conhecidas na especialidade, tal como descrito em, por exemplo, Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, p. 169-170. Por exemplo, tal como aí referido, podem conseguir-se condições pouco rigorosas lavando primeiro com SSC 2x (solução salina de citrato padrão)/SDS (dodecilsulfato de sódio) a 0,1% durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Efectuam-se tipicamente duas lavagens. Um maior rigor pode conseguir-se baixando a concentração de sal e/ou aumentando a temperatura. Por exemplo, a lavagem descrita anteriormente pode ser seguida por duas lavagens com SSC 0,1x/SDS a 0,1% durante 15 minutos cada, à temperatura ambiente, seguida por lavagens subsequentes com SSC 0,1x/SDS a 0,1% durante 30 minutos cada, a 55°C. Estas temperaturas podem ser utilizadas com outros protocolos de hibridação e lavagem apresentados aqui e tal como é conhecido dos peritos na especialidade (pode utilizar-se SSPE como sal em vez de SSC, por exemplo). Pode preparar-se SSC 2x/SDS a 0,1% por adição de 50 ml de SSC 20x e 5 ml de SDS a 10% a 445 ml de água. Pode preparar-se SSC 20x por combinação de NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato de sódio (88,2 g/0,015 M) e água, ajuste do pH a 7,0 com NaOH 10 N e seguidamente ajuste do volume a 1 litro. Pode preparar-se SDS a 10% por dissolução de 10 g de SDS em 50 ml de água autoclavada e seguidamente diluindo para 100 ml.

A detecção da sonda proporciona um meio para determinar de uma forma conhecida se a hibridação foi mantida. Tal análise da sonda proporciona um método rápido para identificar genes do presente invento. Os segmentos de nucleótidos utilizados como sondas de acordo com o invento podem ser sintetizados utilizando um sintetizador de ADN e procedimentos padrão. Estas sequências de nucleótidos podem também ser utilizadas como iniciadores de PCR para amplificar genes do presente invento.

As características de hibridação de uma molécula podem ser usadas para definir polinucleótidos utilizados no presente invento. Assim, o presente invento inclui polinucleótidos (e/ou os seus complementares, de preferência os seus complementares completos) que hibridam com um polinucleótido aqui exemplificado. Ou seja, um modo de definir um gene (e a proteína que codifica), por exemplo, é pela sua capacidade de hibridar (em quaisquer das condições aqui especificamente divulgadas) com um gene conhecido ou especificamente exemplificado.

Tal como aqui utilizado, condições "rigorosas" para hibridação referem-se a condições que atingem o mesmo, ou cerca do mesmo, grau de especificidade de hibridação do que as condições utilizadas pelos presentes requerentes. Especificamente, a hibridação de ADN imobilizado em transferências de "Southern" com sondas específicas dos genes marcadas com ^{32}P pode efectuar-se por métodos padrão (consultar, e.g., Maniatis *et al.* 1982). Em geral, a hibridação e subseqüentes lavagens podem ser efectuadas em condições que permitem a detecção de sequências alvo. Para sondas de genes de ADN em cadeia dupla, a hibridação pode ser feita durante a noite a 20-25°C abaixo da temperatura de fusão (T_m) do híbrido de ADN em SSPE 6x, solução de Denhardt 5x, SDS a 0,1%, ADN desnaturado a 0,1 mg/ml. A temperatura de fusão é descrita pela seguinte fórmula (Beltz *et al.* 1983):

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\%G+C) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 600/\text{comprimento da cadeia dupla em pares de bases}$$

As lavagens podem ser tipicamente efectuadas da seguinte forma:

(1) Duas vezes à temperatura ambiente durante 15 minutos em SSPE 1x, SDS a 0,1% (lavagem de baixo rigor).

(2) Uma vez a $T_m - 20^\circ\text{C}$ durante 15 minutos em SSPE 0,2x, SDS a 0,1% (lavagem de rigor moderado).

Para sondas oligonucleotídicas, a hibridação pode ser efectuada durante a noite a $10-20^\circ\text{C}$ abaixo da temperatura de fusão (T_m) do híbrido em SSPE 6x, solução de Denhardt 5x, SDS a 0,1%, ADN desnaturado a 0,1 mg/ml. A T_m para as sondas oligonucleotídicas pode ser determinada pela seguinte fórmula:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{número de pares de bases T/A}) + 4(\text{número de pares de bases G/C})$$

(Suggs *et al.*, 1981).

As lavagens podem ser tipicamente da seguinte forma:

(1) Duas vezes à temperatura ambiente durante 15 minutos em SSPE 1x, SDS a 0,1% (lavagem de baixo rigor).

(2) Uma vez à temperatura de hibridação durante 15 minutos em SSPE 1x, SDS a 0,1% (lavagem de rigor moderado).

Em geral, pode alterar-se o sal e/ou a temperatura para mudar o rigor. Com um fragmento de ADN marcado >70 bases ou próximo, de comprimento, podem utilizar-se as seguintes condições:

Baixo:	SSPE 1x ou 2x, temperatura ambiente
Baixo:	SSPE 1x ou 2x, 42°C
Moderado:	SSPE 0,2x ou 1x, 65°C
Elevado:	SSPE 0,1x, 65°C .

A formação de cadeias duplas e a estabilidade dependem da complementaridade substancial entre as duas cadeias do híbrido e, tal como referido anteriormente, pode ser tolerado um certo grau de não emparelhamento. Assim, as sequências das sondas incluem mutações (tanto simples, como múltiplas), deleções, inserções das sequências descritas e suas combinações, em que as referidas mutações, inserções e deleções permitem a formação de híbridos estáveis com o polinucleótido alvo de interesse. Podem produzir-se mutações, inserções e deleções numa determinada sequência polinucleotídica de várias formas e estes métodos são conhecidos dos peritos da especialidade. No futuro, pode passar-se a conhecer outros métodos.

Tecnologia de PCR. A reacção em cadeia pela polimerase (PCR) é uma síntese repetitiva, enzimática e utilizando iniciadores, de uma sequência de ácido nucleico. Este procedimento é bem conhecido e utilizado usualmente pelos peritos na especialidade (consultar Mullis, patentes U.S. 4 683 195, 4 683 202 e 4 800 159; Saiki *et al.*, 1985). A PCR baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento de ADN de interesse que é flanqueado por dois iniciadores oligonucleotídicos que hibridam com cadeias opostas da sequência alvo. Os iniciadores são de preferência orientados com as extremidades 3' apontando uma para a outra. Os ciclos repetidos de desnaturação por calor do molde, hibridação dos iniciadores com as suas sequências complementares e extensão dos iniciadores hibridados com uma ADN-polimerase resultam na amplificação do segmento definido pelas extremidades 5' dos iniciadores de PCR. O produto de extensão de cada iniciador pode servir como um molde para o outro iniciador, de modo que cada ciclo essencialmente duplica a quantidade de fragmento de ADN produzida no ciclo anterior. Tal resulta na acumulação exponencial do fragmento alvo específico, até vários milhões de vezes em algumas horas. Utilizando uma ADN-polimerase termoestável, tal como a polimerase *Taq* isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, o processo de amplificação pode ser completamente automatizado. São conhecidas dos peritos na especialidade outras enzimas que podem ser utilizadas.

Podem utilizar-se sequências de ADN exemplificadas, ou seus segmentos, como iniciadores para amplificação por PCR. Na realização da amplificação por PCR, pode tolerar-se um certo grau de não emparelhamento entre o iniciador e o molde, tais como mutações, deleções e inserções (especialmente adições de nucleótidos na extremidade 5') dos iniciadores exemplificados. As mutações, inserções e deleções podem ser produzidas num determinado iniciador por métodos conhecidos pelos peritos na especialidade.

Modificação de genes e proteínas. Os presentes genes e proteínas podem ser fundidos com outros genes e proteínas para produzir proteínas quiméricas ou de fusão. Os genes e proteínas úteis de acordo com o presente invento incluem não só as sequências completas especificamente exemplificadas, mas também partes, segmentos e/ou fragmentos (incluindo fragmentos contíguos e internos e/ou deleções terminais comparativamente com as moléculas completas) destas sequências, suas variantes, mutantes, quimeras e fusões. As proteínas podem ter aminoácidos substituídos desde que retenham a actividade funcional pretendida. Os genes "variantes" têm sequências de nucleótidos que codificam as mesmas proteínas ou proteínas equivalentes com actividade equivalente ou semelhante a uma proteína exemplificada. As expressões "proteínas variantes" e "proteínas equivalentes" referem-se a proteínas com a mesma ou essencialmente a mesma actividade biológica/funcional contra as pestes alvo e sequências equivalentes tal como as proteínas exemplificadas. Tal como aqui utilizado, a referência a uma sequência "equivalente" refere-se a sequências com substituições, deleções, adições ou inserções de aminoácidos que melhoram ou que não afectam adversamente a actividade numa extensão significativa. Também se incluem nesta definição fragmentos que retêm actividade. Os fragmentos e outros equivalentes que retêm a mesma função ou actividade ou semelhante a um fragmento correspondente de uma proteína exemplificada encontram-se no âmbito do presente invento. Podem efectuar-se alterações, tais como substituições ou adições de aminoácidos, para vários objectivos, tais como aumentar (ou diminuir) a estabilidade da proteína às proteases

(sem diminuir materialmente/substancialmente a actividade funcional da proteína), remoção ou adição de um local de restrição e semelhantes. Podem ser facilmente construídas variações de genes utilizando técnicas padrão para fazer mutações pontuais, por exemplo.

Além disso, a patente U.S. 5 605 793, por exemplo, descreve métodos para gerar diversidade molecular adicional por utilização de re-montagem de ADN após fragmentação aleatória ou focada. Tal pode ser denominado "rearranjo" ("*shuffling*") de genes que tipicamente envolve mistura de fragmentos (de um tamanho pretendido) de duas ou mais moléculas de ADN diferentes, seguido por ciclos repetidos de renaturação. Tal pode melhorar a actividade de uma proteína codificada por um gene de partida. O resultado é uma proteína quimérica com actividade melhorada, especificidade de substrato alterada, estabilidade da enzima aumentada, estereoespecificidade alterada ou outras características.

Pode desenhar-se e dirigir-se a um alvo o "rearranjo" após obtenção e exame das coordenadas atómicas 3D (tridimensionais) e da estrutura cristalina de uma proteína de interesse. Assim, pode dirigir-se um "rearranjo focado" a determinados segmentos de uma proteína que são ideais para modificação, tais como segmentos expostos à superfície e de preferência segmentos não internos que estão envolvidos no enrolamento da proteína e integridade estrutural 3D essencial.

Podem utilizar-se genes variantes para produzir proteínas variantes; podem utilizar-se hospedeiros recombinantes para produzir as proteínas variantes. Utilizando estas técnicas de "rearranjo de genes" ("*gene shuffling*") podem construir-se genes e proteínas equivalentes que compreendem quaisquer 5, 10 ou 20 resíduos (aminoácidos ou nucleótidos) contíguos de qualquer sequência aqui exemplificada. Tal como os peritos na especialidade sabem, as técnicas de rearranjo de genes, por exemplo, podem ser ajustadas para obter equivalentes com, por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296 ou 297 resíduos (aminoácidos ou nucleótidos) contíguos, correspondentes a um segmento (do mesmo tamanho) em qualquer das sequências exemplificadas ou sugeridas (ou os seus complementares (complementares totais)). Podem também utilizar-se segmentos com iguais tamanhos, especialmente aqueles para regiões conservadas, como sondas e/ou iniciadores.

Podem preparar-se fragmentos de genes completos utilizando exonucleases ou endonucleases disponíveis comercialmente de acordo com procedimentos padrão. Por exemplo, podem utilizar-se enzimas tais como *Bal31* ou mutagénese dirigida ao local para cortar sistematicamente nucleótidos das extremidades destes genes. Adicionalmente podem obter-se genes que codificam fragmentos activos utilizando uma variedade de enzimas de restrição. Podem utilizar-se proteases para obter directamente fragmentos activos destas proteínas.

Divulgam-se aqui proteínas que podem ser truncadas e mesmo assim mantêm actividade funcional. "Proteína truncada" significa que uma parte de uma proteína pode ser cortada e a proteína truncada remanescente mantêm e apresenta a actividade pretendida após clivagem. A clivagem pode ser conseguida por várias proteases. Além disso, podem produzir-se proteínas clivadas eficazmente utilizando técnicas de biologia molecular em que se removem bases do ADN que codificam a referida proteína, quer através de digestão com endonucleases de restrição, quer através de outras técnicas disponíveis ao perito na especialidade. Após truncagem, as referidas proteínas podem ser expressas em sistemas heterólogos, tais como *E. coli*, baculovírus, sistemas víricos baseados em plantas, levedura e semelhantes e seguidamente colocados em ensaios de insectos, tal como aqui divulgado, para determinar a actividade. É bem conhecido na especialidade que as proteínas truncadas podem ser produzidas com sucesso de modo a manterem actividade funcional, embora tenham menos do que a sequência completa inteira. Por exemplo, podem utilizar-se proteínas de *B.t.* numa forma truncada (proteína do núcleo) (consultar, e.g., Höfte et al. (1989) e Adang et al. (1985)). Tal como aqui utilizada, a expressão "proteína" pode incluir truncagens activas funcionalmente.

Em alguns casos, especialmente para a expressão em plantas, pode ser vantajoso utilizar genes truncados que expressam proteínas truncadas. Os genes truncados preferidos codificarão tipicamente 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99% da proteína completa.

Determinadas proteínas foram aqui especificamente exemplificadas. Dado que estas proteínas são meramente exemplos de proteínas, deverá ser óbvio que as proteínas variantes ou equivalentes (e as sequências de nucleótidos que codificam os seus equivalentes) têm a mesma actividade ou actividade semelhante às proteínas exemplificadas. As

proteínas equivalentes terão similaridade de aminoácidos (e/ou homologia) com uma proteína exemplificada. A identidade de aminoácidos será tipicamente pelo menos 60%, de preferência pelo menos 75%, com maior preferência pelo menos 80%, ainda com maior preferência pelo menos 90% e pode ser pelo menos 95%. As proteínas preferidas podem também ser definidas em termos de gamas mais específicas de identidade e/ou similaridade. Por exemplo, a identidade e/ou similaridade pode ser de 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99% comparativamente com uma sequência aqui exemplificada ou sugerida. Pode utilizar-se qualquer número listado anteriormente para definir os limites superior e inferior.

Salvo indicação em contrário, tal como aqui utilizada, a percentagem de identidade e/ou similaridade de sequência de dois ácidos nucleicos é determinada utilizando o algoritmo de Karlin e Altschul, 1990, modificado como em Karlin e Altschul 1993. Este algoritmo está incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul *et al.*, 1990. As buscas de nucleótidos BLAST são efectuadas com o programa NBLAST, pontuação = 100, comprimento de palavra = 12. Pode utilizar-se Gapped BLAST tal como descrito em Altschul *et al.*, 1997. Quando se utilizam os programas BLAST e Gapped BLAST, utilizam-se os parâmetros pré-estabelecidos dos programas respectivos (NBLAST e XBLAST). Consultar a página da internet de NCBI/NIH. Para obter alinhamentos com hiatos para objectivos de comparação, utilizou-se a função AlignX do Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, E.U.A.), utilizando os parâmetros pré-estabelecidos. Estes são: uma penalização por abertura de hiato de 15, uma penalização por extensão de hiato de 6,66 e uma gama de penalização de separação de hiato de 8.

Também se podem alterar várias propriedades e características tridimensionais da proteína sem afectar adversamente a actividade/funcionalidade da proteína. Podem ser toleradas/efectuadas substituições de aminoácidos

conservativas para não afectar adversamente a actividade e/ou a configuração tridimensional da molécula. Os aminoácidos podem ser divididos nas seguintes classes: não polares, polares neutros, básicos e ácidos. As substituições conservativas em que um aminoácido de uma classe é substituído por outro aminoácido do mesmo tipo estão no âmbito do presente invento, desde que a substituição não seja negativa para a actividade biológica do composto. A **tabela 5** apresenta uma listagem de exemplos de aminoácidos pertencentes a cada classe.

Tabela 5	
Classe de aminoácido	Exemplos de aminoácidos
Não polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar neutro	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

Em alguns casos, também se podem fazer substituições não conservativas. No entanto, as substituições preferidas não prejudicam significativamente a actividade funcional/biológica da proteína.

Tal como aqui utilizado, uma referência a polinucleótidos "isolados" e/ou proteínas "purificadas" referem-se a estas moléculas quando não estão associadas com outras moléculas com as quais se encontrariam na natureza. Assim, a referência a "isolado" e/ou "purificado" significa o envolvimento da "mão humana" tal como aqui descrito. Por exemplo, um "gene" bacteriano do presente invento colocado numa planta para expressão é um "polinucleótido isolado". De igual modo, uma proteína derivada de uma proteína bacteriana e produzida por uma planta é uma "proteína isolada".

Devido à degenerescência/redundância do código genético, várias sequências de ADN diferentes podem codificar as sequências de aminoácidos aqui divulgadas. Faz parte do conhecimento dos peritos na especialidade como criar sequências de ADN alternativas que codificam as mesmas, ou

essencialmente as mesmas, proteínas. Tal é também discutido mais detalhadamente em seguida na secção intitulada "Optimização da sequência para expressão em plantas."

Optimização da sequência para expressão em plantas. Para obter elevada expressão de genes heterólogos em plantas é geralmente preferido manipular novamente os genes de modo a que sejam expressos mais eficientemente nas células vegetais (no citoplasma). O milho é uma destas planta em que pode ser preferível redesenhar o(s) gene(s) heterólogo(s) antes da transformação para aumentar o seu nível de expressão na referida planta. Assim, uma etapa adicional na concepção de genes que codificam uma proteína bacteriana é a re-manipulação de um gene heterólogo para expressão óptima, utilizando desvio de codões mais proximamente alinhado com a sequência da planta alvo, quer seja uma espécie dicotiledónea, quer seja monocotiledónea. As sequências também podem ser optimizadas para expressão em qualquer um dos tipos de plantas mais específicos aqui discutidos noutra secção.

Hospedeiros transgénicos. Os genes que codificam proteínas do presente invento podem ser introduzidos numa vasta variedade de hospedeiros microbianos ou vegetais. O presente invento inclui células vegetais transgénicas e plantas transgénicas. As plantas preferidas (e células vegetais) são milho, *Arabidopsis*, tabaco, soja, algodão, colza, arroz, trigo, relva e gramíneas de pastos e semelhantes. Também se podem preparar outros tipos de plantas transgénicas de acordo com o presente invento, tais como frutas, vegetais e árvores. Mais geralmente, podem utilizar-se dicotiledóneas e/ou monocotiledóneas em vários aspectos do presente invento.

Em concretizações preferidas, a expressão do gene resulta, directa ou indirectamente, na produção (e manutenção) intracelular da(s) proteína(s) de interesse. Podem tornar-se as plantas resistentes a herbicida desta forma. Tais hospedeiros podem ser referidos como hospedeiros e/ou células transgénicos, recombinantes, transformados e/ou transfectados. Em alguns aspectos deste invento (na clonagem e preparação do

gene de interesse, por exemplo), podem produzir-se células microbianas (de preferência bacterianas) e podem utilizar-se de acordo com técnicas padrão, com o benefício da presente divulgação.

As células vegetais transfectadas com um polinucleótido podem ser regeneradas em plantas inteiras. Utilizando culturas celulares incluindo culturas de células de tecidos, culturas líquidas e culturas em placa. As sementes produzidas e ou utilizadas para gerar plantas são também divulgadas. Também se incluem outros tecidos e partes de plantas na divulgação e de igual modo métodos de produção de plantas ou células compreendendo um polinucleótido. Um método preferido para produzir tais plantas é por plantação de uma semente do presente invento.

Inserção de genes para formar hospedeiros transgênicos. Um aspecto do presente invento é a transformação/transfecção de plantas, células vegetais e outras células hospedeiras com polinucleótidos que expressam proteínas do presente invento. As plantas transformadas desta forma podem tornar-se resistentes a vários herbicidas com diferentes modos de acção.

Está disponível uma vasta gama de métodos para introduzir um gene que codifica uma proteína pretendida no hospedeiro alvo em condições que permitem a manutenção e expressão estáveis do gene. Estes métodos são bem conhecidos dos peritos na especialidade e são descritos, por exemplo, na patente U.S. 5 135 867.

Por exemplo, está disponível um elevado número de vectores de clonagem compreendendo um sistema de replicação em *E. coli* e um marcador que permite a selecção das células transformadas, para preparação para a inserção de genes estanhos em plantas superiores. Os vectores compreendem, por exemplo, pBR322, a série pUC, a série M13mp, pACYC184, etc. Assim, a sequência que codifica a proteína pode ser inserida no vector num local de restrição adequado. O plasmídeo resultante é utilizado para transformação em *E. coli*.

Cultivam-se as células de *E. coli* num meio nutriente adequado, seguidamente recolhem-se e lisam-se. O plasmídeo é recuperado por purificação separando-o do ADN genómico. Geralmente efectua-se análise de sequência, análise de restrição, electroforese e outros métodos bioquímicos-biologia molecular como métodos de análise. Após cada manipulação, a sequência de ADN utilizada pode ser digerida por restrição e ligada à sequência de ADN seguinte. Cada sequência plasmídica pode ser clonada no mesmo ou noutros plasmídeos. Dependendo do método de inserção dos genes pretendidos na planta, podem ser necessárias outras sequências de ADN. Caso de utilize, por exemplo, o plasmídeo Ti ou Ri para a transformação da célula vegetal, então pelo menos a fronteira direita, mas frequentemente a fronteira direita e a esquerda do T-ADN do plasmídeo Ti ou Ri, têm que ser ligadas como regiões flanqueantes dos genes a inserir. A utilização de T-ADN para a transformação de células vegetais tem sido investigada intensamente e está descrita em EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley *et al.* (1986); e An *et al.* (1985).

Está disponível um elevado número de técnicas para inserir ADN numa célula hospedeira vegetal. Essas técnicas incluem transformação com T-ADN utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformação, fusão, injeção, biolística (bombardeamento de micropartícula), fios ("whiskers") de carbeto de silício, feixe de aerossol, PEG ou electroporação, bem como outros métodos possíveis. Caso se utilizem agrobactérias para a transformação, o ADN a ser inserido tem de ser clonado em plasmídeos especiais, nomeadamente num vector intermediário ou num vector binário. Os vectores intermediários podem ser integrados no plasmídeo Ti ou Ri por recombinação homóloga das sequências que são homólogas a sequências no T-ADN. O plasmídeo Ti ou Ri também compreende a região vir necessária para a transferência do T-ADN. Os vectores intermediários não podem replicar-se em agrobactérias. O vector intermediário pode ser transferido para *Agrobacterium tumefaciens* através de uma plasmídeo auxiliador (conjugação). Os vectores binários podem replicar-se tanto em *E. coli*, como em agrobactérias.

Estes compreendem um gene marcador de selecção e um ligante ou poliligante que se encontra enquadrado pelas regiões de fronteira direita e esquerda do T-ADN. Eles podem ser transformados directamente em agrobactérias (Holsters, 1978). A *Agrobacterium* utilizada como célula hospedeira compreende um plasmídeo que transporta a região vir. A região vir é necessária para a transferência do T-ADN para a célula vegetal. Pode também conter T-ADN adicional. A bactéria assim transformada é utilizada para a transformação de células vegetais. Podem cultivar-se vantajosamente explantes de plantas com *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* para a transferência do ADN para a célula vegetal. Podem então regenerar-se plantas completas a partir do material da planta infectado (por exemplo, pedaços de folhas, segmentos de caule, raízes, mas também protoplastos ou células cultivadas em suspensão) num meio adequado que pode conter antibióticos ou biocidas para selecção. As plantas assim obtidas podem então ser ensaiadas quanto à presença de ADN inserido. Não existem requisitos especiais para os plasmídeos no caso de injeção e electroporação. É possível utilizar plasmídeos comuns, tais como, por exemplo, derivados de pUC.

As células transformadas crescem dentro das plantas da forma habitual. Podem formar células germinais e transmitir a(s) característica(s) transformada(s) às plantas da descendência. Estas plantas podem ser cultivadas da forma usual e cruzadas com plantas que têm os mesmos factores hereditários transformados ou outros factores hereditários. Os híbridos resultantes individuais têm as propriedades fenotípicas correspondentes.

Em algumas concretizações preferidas do invento, os genes que codificam a proteína bacteriana são expressos a partir de unidades de transcrição inseridas no genoma da planta. De preferência, as referidas unidades de transcrição são vectores recombinantes capazes de integração estável no genoma da planta e permitem a selecção das linhas de plantas transformadas que expressam o ARNm que codifica as proteínas.

Uma vez que o ADN inserido seja integrado no genoma, é aí relativamente estável (e não volta a sair). Normalmente contém um marcador seleccionável que confere às células vegetais transformadas resistência a um biocida ou a um antibiótico, tais como canamicina, G418, bleomicina, higromicina ou cloranfenicol, entre outros. Os marcadores seleccionáveis para plantas também proporcionam tipicamente resistência a vários herbicidas tais como glufosinato (*PAT*), glifosato (*EPSPS*), imazetiapir (*AHAS*) e muitos outros. O marcador utilizado individualmente deve assim permitir a selecção das células transformadas e não das células que não contêm o ADN inserido. Os(s) gene(s) de interesse são de preferência expressos por promotores constitutivos ou indutíveis na célula vegetal. Uma vez expresso, o ARNm é traduzido em proteínas, incorporando assim aminoácidos de interesse na proteína. Os genes que codificam uma proteína expressa nas células vegetais podem estar sob o controlo de um promotor constitutivo, um promotor específico de tecido ou um promotor indutíveis.

Existem várias técnicas para introduzir vectores recombinantes estranhos em células vegetais e para obter plantas que mantêm e expressam estavelmente o gene introduzido. Estas técnicas incluem a introdução de material genético que reveste micropartículas directamente em células (patentes U.S. 4 945 050 de Cornell e 5 141 131 de DowElanco, actualmente Dow AgroSciences, LLC). Além disso, as plantas podem ser transformadas utilizando tecnologia de *Agrobacterium*, consultar patente U.S. 5 177 010 de Universidade de Toledo; 5 104 310 de Texas A&M; pedido de patente europeia 0131624B1; pedidos de patente europeia 120516, 159418B1 e 176 112 de Schilperoot; patentes U.S. 5 149 645, 5 469 976, 5 464 763 e 4 940 838 e 4 693 976 de Schilperoot; pedidos de patente europeia 116718, 290799, 320500, todas de Max Planck; pedidos de patente europeia 604662 e 627752 e patente U.S. 5 591 616, de Japan Tobacco; pedidos de patente europeia 0267159 e 0292435 e patente U.S. 5 231 019, todas de Ciba Geigy, actualmente Syngenta; patentes U.S. 5 463 174 e 4 762 785, ambas de Calgene; e patentes U.S. 5 004 863 e 5 159 135, ambas de Agracetus.

Outras tecnologias de transformação incluem tecnologia de fios ("whiskers"). Consultar patentes U.S. 5 302 523 e 5 464 765, ambas de Zeneca, actualmente Syngenta. A tecnologia de electroporação também tem sido utilizada para transformar plantas. Consultar WO 87/06614 de Boyce Thompson Institute; patentes U.S. 5 472 869 e 5 384 253, ambas de Dekalb; e WO 92/09696 e WO 93/21335, ambas de Plant Genetic Systems. Além disso, também podem ser utilizados vectores víricos para produzir plantas transgénicas que expressam a proteína de interesse. Por exemplo, podem transformar-se plantas monocotiledóneas com um vector viral utilizando os métodos descritos em patente U.S. 5 569 597 de Mycogen Plant Science e Ciba-Geigy (actualmente Syngenta), bem como patentes U.S. 5 589 367 e 5 316 931, ambas de Biosource, actualmente Large Scale Biology.

Tal como mencionado anteriormente, a forma como a construção de ADN é introduzida na planta hospedeira não é crítica para este invento. Pode utilizar-se qualquer método que proporcione uma transformação eficiente. Por exemplo, descrevem-se aqui vários métodos para transformação de células vegetais e incluem a utilização de plasmídeos Ti ou Ri e semelhantes para efectuar transformação mediada por *Agrobacterium*. Em muitos casos, será desejável ter a construção utilizada para transformação limitada num ou em ambos os lados por fronteiras de T-ADN, mais especificamente a fronteira direita. Tal é particularmente útil quando a construção utiliza *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* como um modo de transformação, embora as fronteiras de T-ADN possam ser úteis com outros modos de transformação. Quando se utiliza *Agrobacterium* para transformação de células vegetais, pode utilizar-se um vector que pode ser introduzido no hospedeiro para recombinação homóloga com T-ADN ou os plasmídeos Ti ou Ri presentes no hospedeiro. A introdução do vector pode ser efectuada através de electroporação, cruzamento triparental e outras técnicas para transformar bactérias Gram-negativas que são conhecidas dos peritos na especialidade. A forma de transformação com vector no hospedeiro de *Agrobacterium* não é crítica para este invento. O

plasmídeo Ti ou Ri contendo o T-ADN para recombinação pode ser capaz ou incapaz de causar formação de galhas e não é crítico para o referido invento desde que os genes vir estejam presentes no referido hospedeiro.

Em alguns casos, quando se utiliza *Agrobacterium* para transformação, a construção de expressão no interior das fronteiras de T-ADN será inserida num vector de amplo espectro tal como pRK2 ou seus derivados, tal como descrito em Ditta *et al.* (1980) e EP 0 120 515. Incluído na construção de expressão e no T-ADN estarão um ou mais marcadores, tal como aqui descrito, que permitem a selecção de *Agrobacterium* transformada e células vegetais transformadas. O marcador específico utilizado não é essencial para este invento, sendo o marcador preferido dependente do hospedeiro e da construção utilizados.

Para a transformação de células vegetais utilizando *Agrobacterium*, podem combinar-se explantes e incubar-se com *Agrobacterium* transformada durante um tempo suficiente para permitir a sua transformação. Após transformação, matam-se as agrobactérias por selecção com o antibiótico adequado e cultivam-se as células vegetais com o meio selectivo adequado. Uma vez formados calos, pode incentivar-se a formação de rebentos por utilização de hormonas de plantas adequadas de acordo com métodos bem conhecidos na especialidade da cultura de tecidos de plantas e regeneração de plantas. No entanto, nem sempre é necessário uma etapa intermediária de calos. Após formação de rebentos, as referidas células vegetais podem ser transferidas para um meio que incentiva a formação de raízes completando assim a regeneração da planta. As plantas podem então ser cultivadas para formação de sementes e as referidas sementes podem ser utilizadas para estabelecer gerações futuras. Independentemente da técnica de transformação, o gene que codifica uma proteína bacteriana é de preferência incorporado num vector de transferência de genes adaptado para expressar o referido gene numa célula vegetal, incluindo no vector um elemento de regulação promotor de plantas, assim

como regiões de terminação de transcrição não traduzidas a 3', tais como Nos e semelhantes.

Além das numerosas tecnologias para transformar plantas, o tipo de tecido que se põe em contacto com os genes heterólogos pode também variar. Tal tecido incluiria, mas não se lhes limitam, tecido embriogénico, tecido de calos de tipo I, II e III, hipocótilo, meristema, tecido de raiz, tecidos para expressão em floema e semelhantes. Praticamente todos os tecidos de planta podem ser transformados durante desdiferenciação utilizando técnicas adequadas aqui descritas.

Tal como mencionado anteriormente, podem ser utilizados vários marcadores seleccionáveis, caso desejado. A preferência por um determinado marcador é deixada à discricção do perito, mas pode ser utilizado qualquer dos seguintes marcadores seleccionáveis conjuntamente com qualquer outro gene não listado aqui que possa funcionar como um marcador seleccionável. Estes marcadores seleccionáveis incluem, mas não se lhes limitam, o gene de aminoglicósido-fosfotransferase de transposição Tn5 (Aph II) que codifica resistência aos antibióticos canamicina, neomicina e G418, bem como os genes que codificam resistência ou tolerância a glifosato; higromicina; metotrexato; fosfotricina (bialafos ou glufosinato); herbicidas imidazolinonas, sulfonilureias e triazolopirimidinas, tais como clorsulfurão; bromoxinil, dalapão e semelhantes.

Além de um marcador seleccionável, pode ser desejável utilizar um gene repórter. Em alguns casos pode utilizar-se um gene repórter com ou sem um marcador seleccionável. Os genes repórter são genes que não estão tipicamente presentes no organismo ou tecido recebedor e tipicamente codificam proteínas que resultam numa alteração fenotípica ou numa propriedade enzimática. Proporcionam-se exemplos de tais genes em Weising *et al.*, 1988. Os genes repórter preferidos incluem beta-glucuronidase (GUS) do locus *uidA* de *E. coli*, o gene de cloranfenicol-acetiltransferase de Tn9 de *E. coli*, a proteína verde fluorescente da medusa bioluminescente *Aequorea victoria*

e os genes de luciferase do pirilampo *Photinus pyralis*. Pode então efectuar-se um ensaio para detectar expressão do gene repórter num momento adequado após introdução do referido gene nas células receptoras. Um destes ensaios preferido implica a utilização do gene que codifica beta-glucuronidase (GUS) do locus *uidA* de *E. coli* tal como descrito por Jefferson *et al.*, (1987) para identificar células transformadas.

Além dos elementos de regulação promotores de plantas, podem utilizar-se eficazmente elementos de regulação promotores de várias fontes em células vegetais para expressar genes estranhos. Por exemplo, podem ser utilizados elementos de regulação promotores de origem bacteriana, tais como o promotor de octopina-sintetase, o promotor de nopalina-sintetase, o promotor de manopina-sintetase; promotores de origem viral, tais como o vírus do mosaico da couve-flor (35S e 19S), 35T (que é um promotor 35S re-manipulado, consultar a patente U.S. 6 166 302, especialmente o exemplo 7E) e semelhantes. Os elementos de regulação promotores de plantas incluem, mas não se lhes limitam, a subunidade pequena (ssu) de ribulose-1,6-bisfosfato (RUBP)-carboxilase, o promotor de beta-conglicinina, o promotor de beta-faseolina, o promotor ADH, promotores de choque térmico e promotores específicos de tecidos. Também podem estar presentes outros elementos, tais como regiões de ligação à matriz, regiões de ligação à estrutura, intrões, facilitadores, sequências de poliadenilação e semelhantes e assim podem melhorar a eficácia de transcrição ou integração do ADN. Tais elementos podem ou não ser necessários para a função do ADN, embora possam proporcionar melhor expressão ou funcionamento do ADN afectando a transcrição, a estabilidade do ARNm e semelhantes. Tais elementos podem ser incluídos no ADN tal como pretendido para obter um desempenho óptimo do ADN transformado na planta. Os elementos típicos incluem, mas não se lhes limitam, Adh-intrão 1, Adh-intrão 6, a sequência de comando da proteína do revestimento do vírus do mosaico de alfafa, sequências UTR de osmotina, a sequência de comando da proteína do revestimento do vírus do raiado fino do milho, bem como outros disponíveis para os peritos na especialidade. Podem também utilizar-se

elementos de regulação promotores constitutivos que dirigem assim a expressão génica contínua em todos os tipos celulares e durante todo o tempo (e.g., actina, ubiquitina, CaMV 35S e semelhantes). Os elementos de regulação promotores específicos de tecidos são responsáveis pela expressão génica em tipos de células ou de tecidos específicos, tais como as folhas ou as sementes (e.g., zeína, oleosina, napina, ACP, globulina e semelhantes) e estes também podem ser utilizados.

Os elementos de regulação promotores podem também ser activos (ou inactivos) durante um determinado estágio do desenvolvimento da planta, bem como activos em tecidos e órgãos da planta. Exemplos destes incluem, mas não se lhes limitam, elementos de regulação promotores específicos do pólen, específicos do embrião, específicos da barba de milho, específicos da fibra de algodão, específicos da raiz, específicos do endosperma da semente ou específicos da fase vegetativa e semelhantes. Em determinadas circunstâncias pode ser desejável utilizar um elemento de regulação promotor indutíveis, que é responsável pela expressão de genes em resposta a um sinal específico, tais como: estímulo físico (genes de choque térmico), luz (RUBP-carboxilase), hormona (Em), metabolitos, produtos químicos (sensíveis a tetraciclina) e stress. Podem utilizar-se outros elementos de transcrição e de tradução desejáveis. São conhecidos na especialidade numerosos vectores de transferência de genes específicos de plantas.

Podem também ser utilizados sistemas baseados em ARN de vírus de plantas para expressar proteína bacteriana. Dessa forma, o gene que codifica a proteína pode ser inserido numa região promotora do revestimento de um vírus de planta adequado que infectará a planta hospedeira de interesse. A proteína pode ser então expressa proporcionando assim protecção da planta contra danos por herbicida. Descrevem-se sistemas baseados em ARN de vírus de plantas na patente U.S. 5 500 360 de Mycogen Plant Sciences, Inc. e nas patentes U.S. 5 316 931 e 5 589 367 de Biosource, actualmente Large Scale Biology.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios e publicações aqui referidos ou citados são incorporados por referência na sua totalidade na medida em que não sejam inconsistentes com os ensinamentos explícitos do presente fascículo.

Os seguintes exemplos ilustram procedimentos para pôr o invento em prática. Estes exemplos não devem ser interpretados como limitativos. Todas as percentagens são em peso e todas as proporções de misturas de solventes são em volume, salvo indicação em contrário.

Exemplo 1 - Método para identificar genes que conferem resistência a 2,4-D na planta

Como meio para identificar genes que possuem actividades de degradação de herbicidas na planta, é possível explorar bases de dados públicas actuais, tais como NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para iniciar o processo, é necessário ter uma sequência de um gene funcional já identificada que codifica uma proteína com as características pretendidas (i.e., actividade de α -cetoglutarato-dioxigenase). Esta sequência de proteína é então utilizada como entrada para o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) para comparar com as sequências disponíveis depositadas em NCBI. Utilizando configurações pré-estabelecidas, esta busca resulta em mais de 100 sequências de proteínas homólogas a vários níveis. Estas variam entre altamente idênticas (85-98%) e identidade muito baixa (23-32%) ao nível dos aminoácidos. Tradicionalmente, apenas é de esperar que as sequências com elevada homologia mantenham propriedades semelhantes à sequência de entrada. Neste caso seleccionamos apenas as sequências com $\leq 50\%$ de homologia. Vamos exemplificar que a clonagem e expressão recombinante de homólogos com apenas 27% de conservação de aminoácidos pode ser utilizada para conferir níveis comerciais de resistências não só ao herbicida pretendido, mas também a substratos nunca antes ensaiados com estas enzimas.

PCR e clonagem do gene em pET. Identificou-se um único gene (*rdpA*) na base de dados NCBI (consultar a página da internet ncbi.nlm.nih.gov; n.º de acesso AF516752) como um homólogo com apenas 28% de identidade de aminoácidos com *tfdA* de *Ralstonia eutropha*. Determinou-se a percentagem de identidade traduzindo primeiro ambas as sequências de ADN, de *rdpA* e *tfdA*, depositadas na base de dados para proteínas, e seguidamente utilizando ClustalW no utilitário VectorNTI para fazer o alinhamento de sequências múltiplas.

Obteve-se a estirpe de *Sphingobium herbicidovorans* contendo o gene *rdpA* de ATCC (American Type Culture Collection estirpe n.º 700291). Reavivou-se a estirpe liofilizada de acordo com o protocolo de ATCC e armazenou-se a -80°C em glicerol a 20% para uso interno como estirpe bacteriana Dow DB 536. A partir desta solução-mãe congelada riscou-se uma placa em ágar-ágar de soja tríptica com uma ansa de células para isolamento e incubaram-se a 28°C durante 3 dias.

Utilizou-se uma única colónia para inocular 100 ml de meio de soja tríptica num matraz de três aletas de 500 ml, que foi incubado durante a noite a 28°C num agitador de modelo chão a 150 rpm. A partir de tal, isolou-se o ADN total com o protocolo para Gram-negativas do kit DNeasy da Qiagen (n.º cat. Qiagen 69504). Conceberam-se os seguintes iniciadores para amplificar o gene alvo a partir do ADN genómico, Directo: 5' TCT AGA AGG AGA TAT ACC ATG CAT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC CAG CG 3' [(SEQ ID NO:1) (adiciona um local de restrição Xba I e um local de ligação ao ribossoma (RBS))] e Inverso: 5' CTC GAG TTA CTA GCG CGC CGG GCG CAC GCC ACC GAC CG 3' [(SEQ ID NO:2) (adiciona um codão de paragem adicional e um local XhoI)].

Estabeleceram-se reacções de vinte microlitros da seguinte forma: 8 µl de MasterMix, 1 µl de cada iniciador (50 pmol/µl), 2,5 µl de gDNA, 7,5 µl de H₂O. Efectuou-se então a PCR nas seguintes condições: 94°C 45 s, 52°C 1,5 minutos, 72°C 1,5 minutos, durante 30 ciclos, seguido por um ciclo final de

72°C 5 minutos, utilizando o *kit* Master Taq de Eppendorf (n.º cat. Eppendorf 0032 002.250). O produto de PCR resultante de ~1 kb foi clonado em pCR 2.1 (n.º cat. Invitrogen K4550-40) seguindo o protocolo incluso, com a estirpe hospedeira *E. coli* TOP10F' quimicamente competente, para verificação da sequência de nucleótidos.

Repicaram-se dez das colónias brancas resultantes para 4 ml de meio Luria + canamicina (LB K) a 50 µg/ml e cultivaram-se durante a noite a 37°C com agitação. Purificaram-se os plasmídeos de cada cultura utilizando o *kit* Promega Wizard Plus SV (n.º cat. Promega A1460) e seguindo o protocolo incluso. Efectuou-se sequenciação com o *kit* Quick Start de Beckman CEQ (n.º cat. Beckman Coulter 608120) utilizando iniciadores M13 directo (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') (SEQ ID NO:16) e inverso (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (SEQ ID NO:17), segundo as instruções dos fabricantes. A esta sequência génica (SEQ ID NO:3) e à sua proteína correspondente (SEQ ID NO:9) foi atribuída uma nova denominação geral para coerência interna *AAD-1 (v1)* (AriloxiAlcanoato-Dioxigenase).

Utilizando as enzimas de restrição correspondentes aos locais adicionados com os ligantes de iniciador (Xba 1, Xho 1) cortou-se o *AAD-1 (v1)* do vector pCR2.1 e ligou-se ao vector pET 280 resistente a estreptomicina/espectinomicina. Transformaram-se então os produtos ligados em *E. coli* TOP10F' e plaquearam-se em placas de ágar-ágar de meio Luria + estreptomicina e espectinomicina a 50 µg/ml (LB S/S). Para diferenciar entre ligações *AAD-1 (v1):pET 280* e *pCR2.1:pET 280* repicaram-se aproximadamente 20 colónias isoladas para 6 ml de LB S/S e cultivaram-se a 37°C durante 4 horas com agitação.

Cada cultura foi então plaqueada em placas LB K, que foram incubadas a 37°C durante a noite. Assumiu-se que as colónias que crescem em LB K têm o vector pCR2.1 ligado e foram rejeitadas. Isolaram-se plasmídeos das restantes culturas, tal como anteriormente. Esta construção de expressão foi denominada pDAB 3203.

Exemplo 2 - Expressão e ensaio

2.1 - Análise de HPLC.

O plasmídeo pDAB 3203 foi mantido congelado a -80°C em células TOP10F' (Invitrogen) como a estirpe Dow Recombinante DR 1878. Para a expressão, transformou-se ADN plasmídico purificado da cultura TOP10F' utilizando o *kit* Wizard da Promega (n.º cat. Fisher PR-A1460) em células BL-21 Star (DE3) (n.º cat. Invitrogen C6010-03) seguindo o protocolo do fabricante. Após transformação, plaquearam-se 50 μl das células em placas de ágar-ágar LB S/S e incubaram-se durante a noite a 37°C .

Na manhã seguinte, raspavam-se todas as colónias de toda a placa para 100 ml de LB num matraz de três aletas de 500 ml e incubaram-se a $37^{\circ}\text{C}/200$ rpm durante 1 h. Induziu-se então expressão génica com IPTG 1 mM e incubou-se durante 4 h a $30^{\circ}\text{C}/200$ rpm. Centrifugaram-se todos os 100 ml da cultura a 4000 rpm durante 20 min. Rejeitaram-se então os sobrenadantes e ressuspenderam-se os sedimentos em 10 ml de MOPS 50 mM. Estes foram então sujeitos a três ciclos de ultra-sons de 45 s para lisar as células. Seguidamente centrifugaram-se os lisados a 15 000 rpm para remover os resíduos celulares. Pipetou-se o sobrenadante e armazenou-se a 4°C . Para verificar a expressão recombinante, correu-se uma alíquota de 20 μl num gel de Tris glicina a 4-20% (n.º de cat. Invitrogen EC60255).

Após confirmação da expressão ensaiou-se a actividade enzimática da seguinte forma. Primeiro dessalinizou-se uma alíquota do extracto celular com um cartucho PD-10 (n.º de cat. Amersham 17-0435-01). Tal foi então utilizado para as reacções enzimáticas com herbicida subsequentes.

Para cada reacção, combinaram-se os seguintes: 2,4-D (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$), [ascorbato (1 mM), ião ferroso (50 μM), α -cetogluturato (1 mM) em MOPS 100 mM], extracto celular (100 μl). Esta reacção foi então incubada à temperatura ambiente durante 30 min, após os quais se parou a reacção com a adição de HCl 0,1 N até pH entre 2 e 3. Metade do volume

reaccional (~500 µl) foi posto de lado para o bioensaio, o volume restante foi extraído organicamente utilizando tubos de extracção de fase sólida (n.º de cat. Fisher 11-131-6), eluindo com 400 µl de acetonitrilo + TFA a 0,05%.

Os extractos foram então ensaiados em HPLC quanto à perda do pico de 2,4-D ou à presença de quaisquer picos adicionais resultantes da degradação ou modificação do 2,4-D. As condições para a HPLC foram: Luna 10 µ C18(2) 250 x 4,6 mm (n.º de cat. Phenomenex 00G-4253-E0), corrido a ACN a 50% + TFA a 0,05%: H₂O a 50% + TFA a 0,05% até ACN a 100% + TFA a 0,05% ao longo de 5 min.

2.2 - Bioensaios de ensaio de placas para degradação de herbicida.

Utilizaram-se bioensaios de plantas para determinar se a transformação enzimática do herbicida *in vitro* resultava numa perda concomitante da actividade herbicida. Dada a natureza selectiva dos herbicidas ensaiados (i.e., plantas monocotiledóneas controladas por herbicidas AOPP e plantas dicotiledóneas controladas por herbicidas auxínicos), utilizaram-se *Agrostis palustris* var. Pencross e *Arabidopsis thaliana* var. Columbia de tipo selvagem como espécies de ensaio de monocotiledóneas e dicotiledóneas, respectivamente. Cada uma das espécies é passível de germinação e cultura em pequenas placas de Petri.

Esterilizou-se a superfície de sementes de *Arabidopsis* durante 10 min. em lixívia comercial/água desionizada a 50% (v/v) com adição de 1 µL de Tween-20 como agente de molhagem, com agitação vigorosa (agitador de bancada a 250 rpm). Decantou-se a solução de lixívia dentro de uma hote estéril e enxaguou-se três vezes com água estéril. Esterilizou-se a superfície de sementes de *Agrostis* durante 20 minutos de uma forma semelhante.

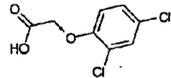
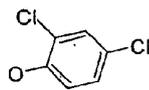
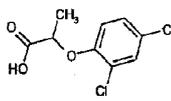
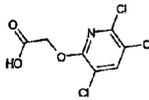
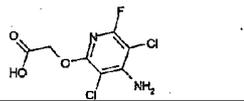
Adicionaram-se vinte a trinta sementes esterilizadas, para cada espécie de ensaio utilizada, a meio de ensaio de placas

de ágar-ágar sólido estéril (PTM) [KNO_3 2,5 mM, KH_2PO_4 2,5 mM, FeSO_4 50 mM, NaEDTA 10 mM (pH 8,0), MgSO_4 2 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM, H_3BO_3 70 μM , MnCl_2 14 μM , CuSO_4 0,5 μM , ZnSO_4 1 μM , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , NaCl 10 μM , $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 nM, sacarose a 0,8% (p/v), agarose a 0,4% (p/v)] para o bioensaio em placas de Petri 60x15 mm (Falcon 1007). Modificou-se adicionalmente o PTM por adição de até seis taxas de padrões de herbicida de ensaio ou de diluições de solução de ensaio de herbicida-enzima de modo que os aumentos de concentração de quatro vezes abrangessem uma gama de taxas de três ordens de grandeza com a taxa GR_{50} (50% de redução de crescimento) aproximadamente no centro da gama.

Para as soluções de ensaio de herbicida-enzima, determinou-se a concentração máxima com base na concentração nominal antes de ocorrência de qualquer degradação enzimática subsequente. Espalharam-se homoganeamente as sementes por adição de 3 ml de PTM fundido com a mesma composição, agitou-se por rotação e deixou-se solidificar. Selaram-se as placas e mantiveram-se em condições estéreis numa câmara de cultura de baixa iluminação (24 h dia^{-1} , 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, 23°C) durante 7 dias. Mediu-se o comprimento da raiz e da raiz + rebento em cinco plantas *Arabidopsis* e *Agrostis*, respectivamente, escolhidas aleatoriamente, comprimento médio (percentagem de controlo não tratado) relativamente a concentração nominal de herbicida e determinou-se GR_{50} .

Este bioensaio foi utilizado para confirmar a perda de actividade herbicida em resultado de degradação por AAD-1 (v1) da cadeia lateral de oxialcanoatos de vários herbicidas agronomicamente relevantes. Em vários casos, o produto fenólico antecipado co-eluiu com o ácido parental em HPLC e o bioensaio serviu como um rastreio primário da degradação do herbicida. As **tabelas 6 e 7** representam os substratos herbicidas ensaiados.

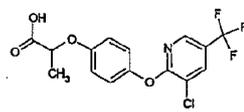
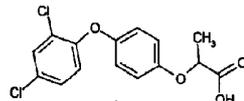
Tabela 6. Bioensaio de ensaio de placas de *Arabidopsis* para substratos fenoxi e piridiniloxialcanoato auxina comerciais.

Produto químico ensaiado	GR ₅₀ (nM)			Razão GR ₅₀ **	Estrutura
	Produto químico sozinho	Produto químico + vector branco*	Produto químico + AAD-1 v1		
2,4-D	22	17	267	16	
DCP	>1000	nd	Nd	nd	
Diclorprop	nd	30	1000	33	
Triclopir	255	1000	1000	1	
Fluroxipir	2200	2250	1825	<1	

* O vector branco representa um tratamento de lisado celular em que o vector de *E. coli* pET não tinha inserção de gene.

** A razão GR₅₀ é uma medida da perda de actividade herbicida do tratamento de lisado que expressa enzima relativamente a tratamentos com vector branco. Considera-se que um número ≥ 2 é o limiar para detectar perda de actividade herbicida com este ensaio.

Tabela 7. Bioensaio de ensaio de placas de *Agrostis* para substratos que inibem ariloxifenoxialcanoatos ACCase comerciais.

Produto químico ensaiado	GR ₅₀ (nM)			Razão GR ₅₀ **	Estrutura
	Produto químico sozinho	Produto químico + vector branco*	Produto químico + AAD-1 v1		
Haloxifop-RS	28	21	520	25	
Diclofop-RS	nd	20	130	7	

* O vector branco representa um tratamento de lisado celular em que o vector de *E. coli* pET não tinha inserção de gene.

** A razão GR₅₀ é uma medida da perda de actividade herbicida do tratamento de lisado que expressa enzima relativamente a tratamentos com vector branco. Considera-se que um número ≥ 2 é o limiar para detectar perda de actividade herbicida com este ensaio.

2.3 - Resultados de HPLC.

Sabia-se da literatura que as enzimas dioxigenase nesta classe requerem α -cetoglutarato como co-substrato (para um esquema geral, consultar a **figura 1**) e ião ferroso para se ligar ao local activo. Outras experiências na literatura demonstraram que a adição de ascorbato aumentou a actividade enzimática mantendo o ferro no estado reduzido, evitando assim que a enzima seja degradada. Com base neste trabalho anterior, estabeleceram-se ensaios iniciais assumindo que a presente enzima funcionaria da mesma forma que os outros membros desta classe geral de enzimas.

Surpreendentemente, os resultados iniciais de HPLC demonstraram a presença de um novo pico a 6,1 minutos, além de um pico de 2,4-D reduzido a 5,5 min. Este novo pico não se encontrava presente no ensaio de controlo. Para uma identificação inicial do pico a 6,1 minutos, correu-se um controlo de DCP nas nossas condições de ensaio e previsivelmente este também eluiu a 6,1 minutos. A formação deste produto foi confirmada utilizando um ensaio colorimétrico para detectar fenóis (consultar exemplo 3.1), bem como espectrometria de massa. Tal como esperado, AAD-1 (v1) efectua uma reacção semelhante à dos outros membros desta classe de enzimas. No bioensaio, verificou-se que estas mesmas amostras têm uma perda praticamente completa de actividade herbicida de 2,4-D no ensaio de placas de *Arabidopsis* (**figura 2**). Independentemente das condições específicas do ensaio (i.e., incubações mais longas, mais enzima), apenas 50-75% do 2,4-D pôde ser degradado em DCP, tal como medido por HPLC. De facto, a indução mais prolongada das células de *E. coli* BL-21 com IPTG resultou apenas em menos enzima activa, embora se tenha expresso mais proteína recombinante total.

Após demonstrar a degradação de 2,4-D, ensaiaram-se substratos adicionais com substituições semelhantes no anel (i.e., oxiacetatos e oxipropionatos). Os primeiros compostos ensaiados foram os análogos de piridina, fluroxipir e

triclopir, que são piridiniloxiacetatos. Não se detectou qualquer actividade enzimática em qualquer destes substratos. Ensaio adicionais em vários análogos destes dois piridiniloxiacetatos com os grupos flúor ou amino removidos também não foram degradados. Curiosamente, no entanto, a adição de um flúor na posição 5 de 2,4-D resultou numa perda quase total de degradação enzimática (consultar a próxima secção para resultados adicionais).

Ensaíram-se então os inibidores de ACCase, haloxifop e diclofop, utilizando as mesmas condições que com o 2,4-D. (Os correspondentes metabolitos fenólicos co-eluíram com o composto parental nas condições de HPLC utilizadas.) Os resultados do bioensaio para estas amostras mostraram perda de actividade herbicida tanto contra haloxifop (**figura 3**), como diclofop. Estes resultados foram também confirmados pelo ensaio colorimétrico, que foi também utilizado para ensaiar uma amostra mais ampla destes compostos.

2.4 - Bioensaios de teste de placas para degradação de herbicida.

Os resultados dos testes de bioensaio corroboraram os resultados de HPLC iniciais que indicaram perda de 2,4-D parental após incubação de soluções de 2,4-D com extractos de AAD-1 (v1) recombinante não purificada (**figura 2**). Adicionalmente, a actividade herbicida do ácido fenoxipropiónico, diclorprop, foi também degradada eficazmente. A razão entre GR₅₀ nominal para a solução herbicida + enzima e a solução apenas de herbicida foi utilizada como uma medida da perda de actividade do herbicida parental resultante da actividade enzimática. Uma razão de 2-3 correlaciona-se tipicamente com 50-75% de perda de actividade herbicida parental (**tabela 6**). Frequentemente não foi possível determinar GR₅₀ após tratamento com enzima; de facto, não permaneceu qualquer actividade herbicida detectável.

Igualmente, a classe de herbicidas AOPP serviu como excelente substrato para AAD-1 (v1) tal como demonstrado pela

degradação praticamente completa da actividade graminicida utilizando o bioensaio de placas de *Agrostis* (**figura 3 e tabela 7**). Estes dados são significativos porque é a primeira observação relatada para qualquer membro desta classe de enzimas que é activa em herbicidas que não são fenoxiauxinas. As implicações são que esta enzima é suficientemente promíscua para utilizar produtos químicos com subestruturas semelhantes a fenoxialcanoatos, embora tenham modos de acção como herbicidas completamente diferentes.

Exemplo 3 - Ensaio *in vitro* da actividade de AAD-1 (v1) através de detecção colorimétrica de fenol

3.1 Ensaio de AAD-1 (v1).

Mediu-se a actividade da enzima AAD-1 (v1) por detecção colorimétrica do produto fenólico utilizando um protocolo de Fukumori e Hausinger (1993) (*J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317) modificado para permitir desenvolvimento num formato de microplaca de 96 poços. O ensaio colorimétrico foi descrito para utilização na medição da actividade de dioxigenases que clivam 2,4-D e diclorprop para libertar o produto 2,4-diclorofenol. No entanto, potencialmente, podem ser libertados outros fenóis de herbicidas ariloxialcanoatos diferentes, tais como haloxifop e ci-halofop (consultar **figura 4**). Comparou-se o rendimento de cor de vários fenóis relativamente ao de 2,4-diclorofenol utilizando o método de detecção previamente descrito para avaliar quais dos produtos fenólicos podiam ser facilmente detectados. Ensaíram-se os fenóis e os análogos de fenol a uma concentração final de 100 µM em 0,15 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 contendo $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2$ 200 µM, ascorbato de sódio 200 µM. Os fenóis derivados de haloxifop e ci-halofop tinham rendimentos de cor equivalentes ao de 2,4-Diclorofenol e portanto foram facilmente detectados. Os piridinóis derivados de fluroxipir e triclopipir não produziram cor significativa. O rendimento de cor de 2,4-diclorofenol e do fenol de haloxifop foi linear e proporcional à concentração de fenol no ensaio até ~500 µM. Uma curva de calibração efectuada em condições padrão de

ensaio (160 μ l de volume final de ensaio) indicou que se obtinha uma absorvância a 510 nm de 1,0 a partir de fenol 172 μ M.

Efectuaram-se ensaios enzimáticos num volume total de 0,15 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 contendo NH_4FeSO_4 200 μ M, ascorbato de sódio 200 μ M, α -cetogluturato 1 mM, o substrato adequado (adicionado a partir de uma solução mãe 100 mM preparada em DMSO) e enzima. Os ensaios foram iniciados por adição do substrato ariloxialcanoato, enzima ou α -cetogluturato no tempo zero. Após 15 minutos de incubação a 25°C, terminou-se a reacção por adição de 10 μ l de EDTA de sódio 100 mM. Desenvolveu-se a cor por adição de 15 μ l de tampão de pH 10 (3,09 g de ácido bórico + 3,73 g de KCl + 44 ml de KOH 1 N), 1,5 μ l de 4-aminoantipirina a 2% e 1,5 μ l de ferricianeto de potássio a 8%. Após 10 a 20 min, registou-se a absorvância a 510 nm num leitor de microplacas espectrofotométrico. Os brancos continham todos os reagentes excepto a enzima para contabilizar as pequenas contaminações ocasionais de alguns dos substratos com pequenas quantidades de fenóis. Posteriormente, os ensaios foram efectuados mais convenientemente consolidando as adições da seguinte forma: a reacção foi parada por adição de 30 μ l de uma mistura 1:1:1 de EDTA Na 50 mM; tampão pH 10 e 4-aminoantipirina a 0,2%, seguidamente adicionando 10 μ l de ferricianeto de potássio a 0,8%.

3.2 - Extracção.

Actividade de AAD-1 (v1) recombinante expressa em *Escherichia coli*. Ressuspenderam-se sedimentos de células de *E. coli* em Tris 0,1 M, pH 7,4 + lisozima a 1 mg/ml (5 ml/células de 250 ml de cultura; 20 ml/células de 1 litro) à temperatura ambiente. Após cerca de 15 minutos com agitação ocasional, congelou-se a suspensão em azoto líquido e seguidamente descongelou-se. Adicionou-se ADNase numa concentração final de 0,02 mg/ml e MgCl_2 1 mM. Após o extracto já não estar viscoso, centrifugou-se o extracto durante 15 min. Passou-se o sobrenadante numa coluna BioRad 10DG pré-

equilibrada com MOPS 20 mM pH 6,75 e armazenou-se o eluato em alíquotas a -70°C . Os ensaios foram efectuados com estes extractos dessalinizados, não purificados, ou com as enzimas purificadas.

Extraiu-se um sedimento celular de uma cultura de 250 ml de células de *E. coli* induzidas que expressam pDAB3203 contendo o gene que codifica AAD-1 (v1) e ensaiou-se usando os protocolos descritos anteriormente. A actividade de clivagem de 2,4-D no extracto de AAD-1 (v1) foi comparada com a de células de *E. coli* que expressam um vector sem AAD-1 (v1) utilizando 2,4-D 1 mM e apresenta-se na **figura 5**. A quantidade de 2,4-diclorofenol formado é claramente proporcional à quantidade de extracto adicionado ao ensaio, enquanto o extracto de controlo não contém qualquer actividade de clivagem de 2,4-D.

A actividade deste extracto foi ensaiada em quatro herbicidas adicionais, (R,S)-diclorprop, (R,S)-mecoprop, (R,S)-haloxifop e (R,S)-diclofop em comparação com 2,4-D (todos a uma concentração final de 0,5 mM) utilizando 4 μl do extracto de *E. coli* por ensaio com um período de ensaio de 15 min. A **figura 6A** mostra que AAD-1 (v1) clivou todos os cinco herbicidas para obter um fenol, sendo a actividade relativa nos substratos diclorprop = mecoprop > diclofop > haloxifop > 2,4-D. Assim, AAD-1 (v1) tem actividade em herbicidas graminicidas ariloxifenoxipropionatos, bem como em fenoxiauxinas.

O extracto de AAD-1 (v1) foi então ensaiado usando (R,S)-haloxifop racémico, sendo o enantiómero R de haloxifop e o enantiómero S de ci-halofop (ambos a 0,5 mM) substratos potenciais para avaliar a possível especificidade enantiomérica de AAD-1 (v1). Os resultados apresentam-se na **figura 6B**. A actividade da enzima em (R)-haloxifop foi equivalente à em (R,S)-haloxifop, enquanto não se verificou qualquer actividade no enantiómero S de ci-halofop indicando que AAD-1 (v1) tem especificidade R nos AOPP.

Exemplo 4 - Especificidade de substrato de AAD-1 (v1)

4.1 - Substratos adicionais de AAD-1 (v1).

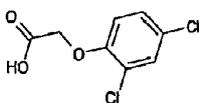
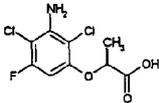
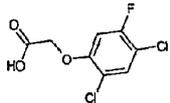
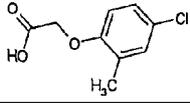
Ensaiou-se a especificidade de substrato de AAD-1 (v1) para vários herbicidas comerciais e experimentais. Utilizou-se AAD-1 (v1) purificada a 1 ou 10 µg por 160 µl de ensaio e cada substrato foi ensaiado a 1 mM com um tempo de ensaio de 15 minutos. A **tabela 3** apresenta A_{510} detectada após a acção de AAD-1 (v1) em vários herbicidas auxínicos ariloxialcanoatos e análogos de auxina. O melhor substrato ensaiado foi diclorprop, sendo mecoprop também clivado eficazmente. Dois outros fenoxipropionatos, os análogos 4-fluoro e 3-amino de diclorprop, também sofreram uma acção eficaz de AAD-1 (v1). AAD-1 (v1) produziu pequenas quantidades de fenol a partir de vários fenoxiacetatos incluindo 2,4-D. As taxas relativas nestes substratos são mais bem estimadas a partir dos ensaios que utilizam a quantidades maiores (10 µg) de AAD-1 (v1). A partir destes dados, 2,4-D é clivado por AAD-1 (v1), tal como dois fenoxialquilsulfonatos, X188476 e X398166 (sesona).

A **tabela 4** apresenta os dados para vários herbicidas graminicidas AOPP como substratos para AAD1 e também o protector cloquintocet. Todos os herbicidas AOPP comerciais ensaiados foram clivados eficazmente por AAD-1 (v1). Tal é uma constatação inesperada e aumenta grandemente a potencial utilidade desta enzima para conferir resistência a uma vasta variedade de herbicidas graminicidas em utilizações transgénicas, para além das auxinas. A AAD-1 (v1) apresenta a maior actividade em quizalofop (76% da taxa de diclorprop) e a actividade mais baixa em ci-halofop (27% da taxa de quizalofop, 21% da taxa de diclorprop). O análogo ariloxiacetato de haloxifop (X043865) foi clivado muito lentamente com apenas um pequeno aumento em A_{510} utilizando a quantidade maior (10 µg) de enzima. Tal é consistente com a maior actividade de AAD-1 (v1) verificada em fenoxipropionatos relativamente a auxinas fenoxiacetatos. A actividade mínima foi detectada em (S)-ci-halofop indicando que AAD-1 (v1) tem uma preferência significativa por enantiómeros R de substratos ariloxipropionato. De igual modo, não se verificou qualquer

actividade contra o protector de quinolinoxiacetato, cloquintocet, o que é consistente com a observação de que AAD-1 (v1) prefere substratos ariloxipropionato relativamente a fenoxiauxinas.

Ensaaiaram-se os substratos X11115427, X124987 e MCPA a 1 mM utilizando 27 µg de AAD-1 (v1) recombinante impura por ensaio. Todos os três compostos foram substratos para AAD-1 (v1) mas com eficácias relativas diferentes (**tabela 8**). X11115427 foi ligeiramente melhor como substrato do que 2,4-D (125% da taxa de 2,4-D) contrariamente ao análogo próximo 3-aminodiclorprop, que é ~7 vezes melhor do que 2,4-D como substrato (**tabela 3**). A substituição 5-F parece diminuir a eficácia de X11115427 como substrato para AAD-1 (v1). As taxas de formação de produto a partir de 5-F-fenoxiacetato e de MCPA foram 32% e 55% da de 2,4-D, respectivamente.

Tabela 8: Efeito de AAD-1 (v1) em três substratos relativamente a 2,4-D. Ensaaiaram-se os substratos tal como na tabela 6 a 1 mM utilizando um extracto de AAD-1 (v1) recombinante impuro de *E. coli*.

Tabela 8. Efeito de AAD-1 (v1) em três substratos relativamente a 2,4-D.				
ID de registo	Estrutura molecular	Composto	A510	% 2,4-D
195517		2,4-D	0,177	100
11115427		(R,S)-3-amino, 5-F-diclorprop	0,221	125
124987		5-F, 2,4-D	0,056	32
192711		MCPA	0,097	55

4.2-Characterização cinética.

Determinaram-se os valores de K_m e k_{cat} de AAD-1 (v1) purificada (consultar exemplo 10) para quatro substratos herbicidas, (R)-diclorprop, (R)-haloxifop, (R)-quizalofop e 2,4-D em condições padrão de ensaio (MOPS 25 mM, pH 6,8; ascorbato Na 200 μM ; Fe^{2+} 200 μM ; α -cetogluturato 1 mM; 25°C). Ajustaram-se as curvas de dose-resposta utilizando o Grafit (Erithacus Software, RU) e apresentam-se os gráficos e as constantes derivadas na **figura 7** e **tabela 9**, respectivamente. Os valores de K_m para os quatro substratos foram praticamente semelhantes (75 - 125 μM), mas os valores de k_{cat} variaram significativamente. O (R)-diclorprop apresentou o valor de k_{cat} mais elevado e o 2,4-D o mais baixo (10% do de (R)-diclorprop). Estes valores de k_{cat} foram consistentes com a gama de valores verificados nos ensaios de especificidade de substrato apresentados na **tabela 3** e **tabela 4** dado que estes foram efectuados a concentrações de substrato (1 mM) elevadas (saturantes).

Tabela 9: Constantes cinéticas para substratos de AAD-1 (v1). As constantes cinéticas foram derivadas dos dados na figura 7 utilizando ajuste com Grafit à equação de Michaelis-Menten.

Tabela 9. Constantes cinéticas para substratos AAD-1 (v1).				
Substrato	K_m (μM) \pm EP	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ AAD1) \pm EP	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
R-diclorprop	75 \pm 10	0,79 \pm 0,03	26,1	348
R-quizalofop	125 \pm 20	0,57 \pm 0,03	18,9	151
R-haloxifop	120 \pm 54	0,34 \pm 0,04	11,2	94
2,4-D	96 \pm 8	0,57 \pm 0,00	2,7	28

Os valores relativos de K_m e k_{cat} para diclorprop e 2,4-D diferem significativamente dos publicados para a dioxigenase específica de R de *Delftia acidovorans* por Westendorf *et al.* (2003) (*Acta Biotechnol.* 23: 3-17). O valor publicado de k_{cat}/K_m para 2,4-D é 0,6% do de diclorprop, enquanto nos nossos estudos o valor de k_{cat}/K_m para 2,4-D é 8% do de diclorprop. Assim, neste estudo, AAD-1 (v1) é inesperadamente eficaz na catálise da clivagem de 2,4-D. Tal aumenta a sua potencial

utilidade para conferir tolerância diversificada a características de herbicidas em aplicações transgênicas.

4.3 - Substratos adicionais para AAD-1 (v1).

Ensaaiaram-se três substratos adicionais a 1 mM utilizando 27 µg de AAD-1 (v1) recombinante impura por ensaio; X11115427, X124987 e MCPA. Os resultados apresentam-se na **tabela 8**. Todos os três compostos foram substratos para AAD-1 (v1) mas com eficácias relativas diferentes. X11115427 foi apenas ligeiramente melhor (125%) como substrato do que 2,4-D. Contrariamente, o 3-aminodiclorprop foi >7 vezes melhor do que o 2,4-D como substrato (**tabela 3**). Assim, a substituição 5-F diminuiu significativamente a eficácia de X11115427 como substrato para AAD-1 (v1). Verificou-se um padrão semelhante com 5-F-2,4-D que é apenas 32% tão eficaz como substrato relativamente a 2,4-D. Neste ensaio, MCPA também foi menos eficaz como substrato de AAD-1 (v1) (55% relativamente a 2,4-D).

Exemplo 5 - Optimização de sequência para expressão em plantas

5.1 - Antecedentes.

Para obter expressão elevada de genes heterólogos em plantas, pode ser preferível re-manipular os referidos genes de modo a que sejam mais eficazmente expressos em células vegetais (no citoplasma). O milho é uma destas plantas em que pode ser preferível re-manipular o(s) gene(s) heterólogo(s) antes da transformação para aumentar o seu nível de expressão na referida planta. Assim, uma etapa adicional na concepção de genes que codificam uma proteína bacteriana é a re-manipulação de um gene heterólogo para expressão óptima.

Uma razão para re-manipular uma proteína bacteriana para expressão em milho é devida ao teor não óptimo de G+C do gene nativo. Por exemplo, o teor muito baixo de G+C de muitos genes bacterianos nativos (e conseqüente desvio para teores elevados de A+T) resulta na geração de sequências que mimetizam ou duplicam as sequências de controlo da planta que se sabe serem altamente ricas em A+T. A presença de algumas das sequências

ricas em A+T no ADN do(s) gene(s) introduzido(s) na planta (e.g., regiões da caixa TATA normalmente encontradas em promotores génicos) pode resultar em transcrição aberrante do(s) gene(s). Por outro lado, a presença de outras sequências de regulação residentes no ARNm transcrito (e.g., sequências de sinal de poliadenilação (AAUAAA) ou sequências complementares a ARN nucleares pequenos envolvidos em *splicing* de pré-ARNm) pode levar a instabilidade de ARN. Assim, um objectivo da concepção de genes que codificam uma proteína bacteriana para expressão em milho, com maior preferência denominados como gene(s) optimizado(s) para plantas, é gerar uma sequência de ADN com um elevado teor de G+C; e de preferência uma próxima da dos genes de milho que codificam enzimas metabólicas. Outro objectivo da concepção de gene(s) optimizado(s) para plantas que codificam uma proteína bacteriana é gerar uma sequência de ADN na qual as modificações na sequência não prejudicam a tradução.

A **tabela 10** ilustra quão elevado é o teor de G+C no milho. Para os dados na **tabela 10** extraíram-se as regiões de codificação dos genes de entradas de GenBank (edição 71) e as composições de bases foram calculadas utilizando o programa MacVectorTM (Accelrys, San Diego, Califórnia). Ignoraram-se as sequências de intrões nos cálculos.

Tabela 10: Compilação dos teores de G + C de regiões codificantes de proteína em genes de milho

Classe de proteínas .sup.a	Gama de % G + C	Média de % G + C.sup.b
Enzimas metabólicas (76)	44,4-75,3	59,0 (.+- .8,0)
Proteínas Estruturais (18)	48,6-70,5	63,6 (.+- .6,7)
Proteínas de regulação (5)	57,2-68,8	62,0 (.+- .4,9)
Proteínas não caracterizadas (9)	41,5-70,3	64,3 (.+- .7,2)
Todas as proteínas (108)	44,4-75,3	60,8 (.+- .5,2)

.sup.a Número de genes na classe apresentado entre parêntesis.

.sup.b Desvio padrão apresentado entre parêntesis.

.sup.c Média dos grupos combinados foi ignorada no cálculo da média

Devido à plasticidade proporcionada pela redundância/degenerescência do código genético (i.e., alguns aminoácidos são especificados por mais do que um codão), a evolução dos genomas em diferentes organismos ou classes de

organismos resultou na utilização diferenciada de códons redundantes. Este "desvio de códons" ("*codon bias*") reflecte-se na composição média de bases das regiões de codificação da proteína. Por exemplo, os organismos com teores relativamente baixos de G+C utilizam códons com A ou T na terceira posição de códons redundantes, enquanto os que têm teores mais elevados de G+C utilizam códons com G ou C na terceira posição. Pensa-se que a presença de códons "minoritários" no interior de um ARNm pode reduzir a taxa de tradução absoluta desse ARNm, especialmente quando a abundância relativa do ARNT carregado correspondente ao códon minoritário é baixa. Uma extensão disto é que a diminuição da taxa de tradução por códons minoritários individuais seria pelo menos aditiva para códons minoritários múltiplos. Assim, os ARNm com teores relativamente elevados de códons minoritários teriam taxas de tradução correspondentemente baixas. Esta taxa seria reflectida por subseqüentes baixos níveis da proteína codificada.

Em genes concebidos por engenharia genética que codificam uma proteína bacteriana para expressão em milho (ou outra planta, tal como algodão ou soja), determinou-se o desvio de códons da planta. O desvio de códons para o milho é a distribuição de códons estatística que a planta usa para codificar as suas proteínas e a utilização preferida de códons apresenta-se na **tabela 11**. Após determinar o desvio, determina-se a percentagem de frequência de códons do(s) gene(s) de interesse. Devem determinar-se os códons de primeira escolha preferidos pela planta, bem como a segunda, terceira e quarta escolha de códons preferidos, quando existem selecções múltiplas. Pode então conceber-se uma nova seqüência de ADN que codifica a seqüência amino da proteína bacteriana, mas a nova seqüência de ADN difere da seqüência de ADN bacteriana nativa (que codifica a proteína) pela substituição por códons da planta (primeira escolha, segunda escolha, terceira escolha ou quarta escolha) para especificar o aminoácido em cada posição na seqüência de aminoácidos da proteína. A nova seqüência é então analisada quanto a locais para enzimas de restrição que possam ter sido criados pela

modificação. Os locais identificados são modificados adicionalmente por substituição dos codões pelos codões preferidos de primeira, segunda, terceira ou quarta escolha. Outros locais na sequência que poderiam afectar a transcrição ou a tradução do gene de interesse são as junções exão:intrão (5' ou 3'), sinais de adição poli A ou sinais de terminação de ARN-polimerase. A sequência é analisada adicionalmente e modificada para reduzir a frequência de dupletos TA ou GC. Além dos dupletos, as sequências de blocos de G ou C que têm mais do que cerca de quatro resíduos iguais podem afectar a transcrição da sequência. Assim, estes blocos são também modificados por substituição dos codões de primeira ou segunda escolha, etc. pelo codão preferido da escolha seguinte.

Tabela 11. Codões de aminoácidos preferidos para proteínas expressas em milho

Aminoácido	Codão*
Alanina	GCC/GCG
Cisteína	TGC/TGT
Ácido aspártico	GAC/GAT
Ácido glutâmico	GAG/GAA
Fenilalanina	TTC/TTT
Glicina	GGC/GGG
Histidina	CAC/CAT
Isoleucina	ATC/ATT
Lisina	AAG/AAA
Leucina	CTG/CTC
Metionina	ATG
Asparagina	AAC/AAT
Prolina	CCG/CCA
Glutamina	CAG/CAA
Arginina	AGG/CGC
Serina	AGC/TCC
Treonina	ACC/ACG
Valina	GTG/GTC
Triptofano	TGG
Tirosina	TAC/TAT
Paragem	TGA/TAG

É preferível que o(s) gene(s) otimizado(s) para plantas que codificam uma proteína bacteriana contenham cerca de 63% de códons de primeira escolha, entre cerca de 22% a cerca de 37% de códons de segunda escolha e entre cerca de 15% a cerca de 0% de códons de terceira ou de quarta escolha, em que a percentagem total é de 100%. O mais preferível é que o(s) gene(s) otimizado(s) para plantas contenham cerca de 63% de códons de primeira escolha, pelo menos cerca de 22% de códons de segunda escolha, cerca de 7,5% de códons de terceira escolha e cerca de 7,5% de códons de quarta escolha, em que a percentagem total é de 100%. O método descrito anteriormente permite que um perito na especialidade modifique o(s) gene(s) que são estranho(s) a uma determinada planta de modo que os genes sejam expressos optimamente em plantas. O método é ilustrado adicionalmente no pedido PCT WO 97/13402.

Assim, de forma a conceber genes otimizados para plantas que codificam uma proteína bacteriana, concebe-se uma sequência de ADN para codificar a sequência de aminoácidos da referida proteína utilizando um código genético redundante estabelecido a partir da tabela de desvios de códons compilada para as sequências de genes de uma determinada planta. A sequência de ADN resultante tem um grau de diversidade de códons mais elevado, uma composição de bases pretendida, pode conter locais de reconhecimento de enzimas de restrição colocados estrategicamente e não tem sequências que possam interferir com a transcrição do gene ou com a tradução do produto de ARNm. Assim, podem utilizar-se genes sintéticos que são funcionalmente equivalentes às proteínas/genes do presente invento para transformar hospedeiros, incluindo plantas. Podem encontrar-se orientações adicionais relativas à produção de genes sintéticos, por exemplo, na patente U.S. 5 380 831.

5.2 - Análise de reconstrução.

Uma análise exaustiva dos 888 pares de bases (pb) da sequência de ADN da região de codificação de AAD-1 (v1) nativa (SEQ ID NO:3) revelou a presença de vários motivos de sequência que se pensa serem prejudiciais à expressão óptima

em plantas, bem como uma composição de códons não óptima. Para melhorar a produção da proteína recombinante em monocotiledóneas, bem como em dicotiledóneas, desenvolveu-se uma sequência de ADN "otimizada para plantas" (SEQ ID NO:5) que codifica SEQ ID NO: 11, que é idêntica à SEQ ID NO:9 nativa excepto pela adição de um resíduo de alanina na segunda posição. O codão de alanina adicional (GCT; sublinhado em SEQ ID NO:5) foi incluído para codificar um local Nco I (CCATGG) que abrange o codão de início ATG, para permitir as operações de clonagem subsequentes. As proteínas codificadas pelas regiões de codificação nativa (v1) e otimizada para plantas (v3) são 99,3% idênticas e diferem apenas no aminoácido número 2. Contrariamente, as sequências de ADN nativa (v1) e otimizada para plantas (v3) das regiões de codificação são apenas 77,7% idênticas. Efectuou-se um alinhamento de sequências dos ADN nativo e otimizado para plantas e a **tabela 12** apresenta as diferenças nas composições de códons das sequências nativa e otimizada para plantas.

Tabela 12. Comparação de composição de códons da região de codificação nativa de *AAD-1* (v1) e versão otimizada para plantas

Amino-ácido	Codão	N.º gene nativo	% de gene nativo	N.º gene opt. plantas	% de gene opt. plantas	Amino-ácido	Codão	N.º gene nativo		N.º gene opt. plantas	% de gene opt. plantas
ALA (A) 22	GCA	2	9,1	5	22	LEU (L) 22	CTA	0	0,0	0	0
	GCC	10	45,5	8	35		CTC	5	22,7	7	32
	GCG	9	40,9	0	0		CTG	16	72,7	0	0
	GCT	1	4,5	10	43		CTT	0	0,0	8	36
ARG (R) 23	AGA	0	0,0	7	30	LYS (K) 7	TTA	0	0,0	0	0
	AGG	0	0,0	7	30		TTG	1	4,5	7	32
	CGA	0	0,0	0	0	MET (M) 13	AAA	1	14,3	2	29
	CGC	16	69,6	5	22		AAG	6	85,7	5	71
	CGG	4	17,4	0	0		ATG	8	100	8	100
ASN (N) 8	CGT	3	13,0	4	17	PHE (F) 17	TTC	10	76,9	9	69
	AAC	8	100,0	4	50		TTT	3	23,1	4	31
ASP (D) 19	AAT	0	0,0	4	50	PRO (P) 15	CCA	1	5,9	8	47
	GAC	15	78,9	10	53		CCC	9	52,9	1	6
CYS (C) 3	GAT	4	21,1	9	47		SER (S) 15	CCG	7	41,2	0
	TGC	3	100,0	2	67	CCT		0	0,0	8	47
END 1	TGT	0	0,0	1	33	AGC		11	73,3	4	27
	TAA	0	0,0	0	0	AGT		0	0,0	0	0
	TAG	1	100,0	0	0	TCA		0	0,0	4	27
GLN (Q) 13	TGA	0	0,0	1	100	THR (T) 23	TCC	2	13,3	3	20
	CAA	0	0,0	7	54		TCG	2	13,3	0	0
GLU (E) 16	CAG	13	100,0	6	46		TCT	0	0,0	4	27
	GAA	8	50,0	5	31		ACA	1	4,3	6	26
GLY (G) 21	GAG	8	50,0	11	69		TRP (W) 10	ACC	16	69,6	9
	GGA	0	0,0	6	29	ACG		5	21,7	0	0
	GGC	15	71,4	7	33	ACT		1	4,3	8	35
	HIS (H) 10	GGG	3	14,3	2	10	TGG	5	100	5	I 100
GGT		3	14,3	6	29	TYR (Y) 28	TAC	7	70,0	6	60
CAC		6	60,0	5	50		TAT	3	30,0	4	40
ILE (I) 12	CAT	4	40,0	5	50	VAL (V) 28	GTA	2	7,1	0	0
	ATA	0	0,0	3	25		GTC	11	39,3	8	29
	ATC	12	100,0	5	42		GTG	15	53,6	10	36
	ATT	0	0,0	4	33		GTT	0	0,0	10	36
Totais		148		149		Totais		148		148	

5.3 - Realização de vectores binários.

5.3.1 - Reconstrução de *AAD-1* (v3). O gene *AAD-1* (v3) otimizado para plantas foi obtido de Picoscript (completou-se a concepção da reconstrução do gene (consultar acima) e encomendou-se a Picoscript a construção) e verificou-se a

sequência (SEQ ID NO:5) internamente, para confirmar que não se encontravam presentes quaisquer alterações da sequência esperada. As reacções de sequenciação foram efectuadas com o iniciador directo M13 (SEQ ID NO: 16) e iniciador inverso M13 (SEQ ID NO: 17) utilizando os reagentes "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter, tal como anteriormente. Analisaram-se os dados da sequência e os resultados indicaram que não estavam presentes quaisquer anomalias na sequência de ADN de *AAD-1* (v3) optimizada para plantas. O gene *AAD-1* (v3) foi clonado em pDAB726 na forma de um fragmento Nco I - Sac I. A construção resultante foi denominada pDAB720, contendo: [promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: *AAD-1* (v3): Nt OSM3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR] (verificado com digestões de restrição com Not I): Clonou-se então um fragmento Not I-Not I contendo a cassette descrita para o local Not I do vector binário pDAB3038. O vector binário resultante, pDAB721, contendo a cassette seguinte [promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: *AAD-1* (v3): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: promotor CsVMV: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] foi digerido por restrição (com Bam HI, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pac I e Xmn I) para verificação da orientação correcta. A construção completa verificada (pDAB721) foi utilizada para transformação em *Agrobacterium* (consultar secção 6.2).

5.3.2 - *AAD1* (v1) nativo e *AAD-1* (v2) modificado. O gene *AAD-1* (v1) (SEQ ID NO:3) foi amplificado por PCR a partir de pDAB3203. Durante a reacção de PCR, efectuaram-se alterações no interior dos iniciadores para introduzir os locais de restrição NcoI e SacI no iniciador 5' e iniciador 3', respectivamente. Utilizaram-se os iniciadores "rdpA(ncoI)" [CCC ATG GCT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC] (SEQ ID NO:6) e "3'saci" [GAG CTC ACT AGC GCG CCG GGC GCA CGC CAC CGA] (SEQ ID NO:7) para amplificar um fragmento de ADN utilizando o sistema de PCR Fail Safe (Epicenter).

Ligou-se o amplicão de PCR no vector de clonagem pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen) e verificou-se a sequência com os iniciadores directo M13 (SEQ ID NO:16) e inverso M13 (SEQ ID

NO:17) utilizando os reagentes de "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter.

Os dados da sequência identificaram um clone com a sequência correcta. Durante a análise identificou-se um local de restrição NotI supérfluo perto da extremidade 3' de AAD-1 (v1). Este local foi removido para facilitar clonagem em pDAB3038. Para remover o local adicional efectuou-se uma reacção PCR com um iniciador 5' interno. O local NotI foi alterado por incorporação de um novo codão para um aminoácido para remover o local NotI ilegítimo. Esta alteração alteraria a arginina na posição 212 para uma cisteína. Foram utilizados os iniciadores de PCR "BstEII/Del NotI" [TGG TGG TGA CCC ATC CGG GCA GCG GCT GCA AGG GCC] (SEQ ID NO:8) e "3' saci" (SEQ ID NO:7).

Completou-se uma reacção de PCR utilizando o sistema PCR Fail Safe (Epicenter) e clonou-se o fragmento resultante no kit de clonagem pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen). Completou-se a confirmação do produto de PCR correcto por sequenciação de ADN e o gene "corrigido" foi denominado AAD-1 (v2) (SEQ ID NO:4).

Uma reacção de sequenciação utilizando o iniciador inverso M13 (SEQ ID NO:17) e os reagentes de "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter indicou que tinha sido isolado o fragmento de PCR correcto. Esta construção foi digerida com as enzimas BstEII e SacI. O fragmento resultante foi clonado na construção pCR2.1 AAD-1 (v2) (pCR2.1 Delta NotI) e confirmado através de digestão com enzimas de restrição.

O gene AAD-1 (v2) modificado foi então clonado em pDAB726 na forma de um fragmento de ADN NcoI/SacI. Verificou-se a construção resultante (pDAB708) com digestões de restrição. Esta construção foi então clonada em pDAB3038 binário na forma de um fragmento NotI - NotI. A construção final resultante foi denominada pDAB766, contendo [promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: AAD-1 (v2): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] e foi digerida por restrição para

verificação da orientação correcta. A construção completa foi então utilizada para transformação em *Agrobacterium*.

5.3.3 - Concepção de uma sequência de ADN com desvio de codões para soja que codifica uma EPSPS de soja com mutações que conferem tolerância a glifosato. Este exemplo apresenta a concepção de uma nova sequência de ADN que codifica uma 5-enolpiruvoílchiquimato-3-fosfato-sintetase (EPSPS) de soja mutada, mas que está otimizada para expressão em células de soja. A sequência de aminoácidos de uma EPSPS de soja triplamente mutada é divulgada como SEQ ID NO:5 de WO 2004/009761. Os aminoácidos mutados na sequência assim divulgada estão no resíduo 183 (treonina da proteína nativa substituída por isoleucina), no resíduo 186 (arginina da proteína nativa substituída por lisina) e no resíduo 187 (prolina da proteína nativa substituída por serina). Assim, pode deduzir-se a sequência de aminoácidos da proteína EPSPS de soja nativa por substituição dos aminoácidos substituídos de SEQ ID NO:5 de WO 2004/009761 pelos aminoácidos nativos nas posições adequadas. Esta sequência da proteína nativa apresenta-se aqui como SEQ ID NO:20. Uma sequência de proteína EPSPS de soja duplamente mutada, contendo uma mutação no resíduo 183 (treonina da proteína nativa substituída por isoleucina) e no resíduo 187 (prolina da proteína nativa substituída por serina) apresenta-se aqui como SEQ ID NO:21.

Obteve-se uma tabela de utilização de codões para sequências de codificação de proteínas de soja (*Glycine max*), calculada a partir de 362 096 codões (aproximadamente 870 sequências de codificação), da página da internet "kazusa.ou.jp/codon". Estes dados foram reformatados tal como apresentados na **tabela 13**. As colunas D e H da **tabela 13** apresentam as distribuições (em % de utilização de todos os codões para esse aminoácido) de codões sinónimos para cada aminoácido, tal como verificado nas regiões de codificação da proteína de genes de soja. É óbvio que alguns codões sinónimos para alguns aminoácidos (um aminoácido pode ser especificado por 1, 2, 3, 4 ou 6 codões) estão presentes bastante raramente nas regiões de codificação de proteína de soja (por exemplo,

comparar a utilização dos codões GCG e GCT para especificar alanina). Calculou-se uma tabela de utilização de codões desviada para soja a partir dos dados da **tabela 13**. Os codões apresentados em genes de soja em menos do que cerca de 10% das ocorrências totais para o aminoácido particular foram ignorados. Para equilibrar a distribuição das restantes escolhas de codão para um aminoácido, calculou-se uma representação média ponderada para cada codão, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ ponderada de C1} = 1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{etc.}) \times \%C1 \times 100$$

em que C1 é o codão em causa, C2, C3, etc. representam os restantes codões sinónimos e os valores de % para os codões relevantes são obtidos das colunas D e H da **tabela 13** (ignorando os valores de codões raros em negrito). O valor da % ponderada para cada codão apresenta-se nas colunas C e G da **tabela 13**. Selecionou-se arbitrariamente TGA como o terminador de tradução. Introduziram-se então as frequências de utilização do codão desviadas numa tabela de código genético especializada para utilização pelo programa de concepção de genes OptGene™ (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Indiana).

Tabela 13. Representação de codões sinónimos em sequências de codificação de proteínas de soja e cálculo de um conjunto de representação de codões desviados para concepção de genes sintéticos otimizados para soja

A	B	C	D	E	F	G	H	
Amino-ácido	Codão	% ponderada	% de soja	Amino-ácido	Codão	% ponderada	% de soja	
ALA (A)	GCA	33,1	30,3	LEU (L)	CTA	NU	9,1	
	GCC	24,5	22,5		CTC	22,4	18,1	
	GCG	NU*	8,5		CTG	16,3	13,2	
	GCT	42,3	38,7		CTT	31,5	25,5	
ARG (R)	AGA	36,0	30,9		TTA	NU	9,8	
	AGG	32,2	27,6		TTG	29,9	24,2	
	CGA	NU	8,2		LYS (K)	AAA	42,5	42,5
	CGC	14,8	12,7			AAG	57,5	57,5
CGG	NU	6,0	MET (M)	ATG	100,0	100		
	CGT	16,9		14,5	PHE (F)	TTC	49,2	49,2
ASN (N)	AAC	50,0	50,0	PRO (P)		TTT	50,8	50,8
	AAT	50,0	50,0		CCA	39,8	36,5	
ASP (D)	GAC	38,1	38,1		CCC	20,9	19,2	
	GAT	61,9	61,9		CCG	NU	8,3	
CYS (C)	TGC	50,0	50,0	CCT	39,3	36,0		
	TGT	50,0	50,0	SER (S)	AGC	16,0	15,1	
END	TAA	NU	40,7		AGT	18,2	17,1	
	TAG	NU	22,7		TCA	21,9	20,6	
	TGA	100,0	36,6		TCC	18,0	16,9	
GLN (Q)	CAA	55,5	55,5		TCG	NU	6,1	
	CAG	44,5	44,5		TCT	25,8	24,2	
GLU (E)	GAA	50,5	50,5		THR (T)	ACA	32,4	29,7
	GAG	49,5	49,5			ACC	30,2	27,7
GLY (G)	GGA	31,9	31,9	ACG		NU	8,3	
	GGC	19,3	19,3	ACT	37,4	34,3		
	GGG	18,4	18,4	TRP (W)	TGG	100,0	100	
	GGT	30,4	30,4	TYR (Y)	TAC	48,2	48,2	
HIS (H)	CAC	44,8	44,8		TAT	51,8	51,8	
	CAT	55,2	55,2	VAL (V)	GTA	11,5	11,5	
ILE (I)	ATA	23,4	23,4		GTC	17,8	17,8	
	ATC	29,9	29,9		GTG	32,0	32,0	
	ATT	46,7	46,7		GTT	38,7	38,7	

*NU = Não Usar

Para derivar uma sequência de ADN otimizada para soja que codifica a proteína EPSPS duplamente mutada, efectuou-se tradução inversa da proteína da sequência de SEQ ID NO:21 pelo programa OptGene™ utilizando o código genético desviado para soja derivado anteriormente. A sequência de ADN inicial assim derivada foi então modificada para compensar as alterações de codões (mantendo a representação da média ponderada global para os codões) para reduzir o número de dupletos CG e TA entre codões adjacentes, aumentar os números de dupletos CT e

TG entre códões adjacentes, remover estruturas secundárias intra-cadeia altamente estáveis, remover ou adicionar locais de reconhecimento para enzimas de restrição e para remover outras sequências que possam ser prejudiciais para a expressão ou manipulações de clonagem do gene concebido por engenharia genética. Efectuaram-se refinamentos adicionais da sequência por eliminação de potenciais locais de *splicing* de intrões de planta, cadeias longas de resíduos A/T ou C/G e outros motivos que possam interferir com a estabilidade do ARN, transcrição ou tradução da região de codificação em células vegetais. Foram efectuadas outras alterações para eliminar quadros de leitura abertos internos longos (quadros diferentes de +1). Todas estas alterações foram efectuadas considerando as restrições para manutenção da composição desviada para soja, tal como descrito anteriormente, e mantendo a sequência de aminoácidos divulgada como SEQ ID NO:21.

A sequência de ADN desviada para soja que codifica a proteína EPSPS de SEQ ID NO:21 é apresentada como as bases 1-1575 de SEQ ID NO:22. A síntese de um fragmento de ADN compreendendo SEQ ID NO:22 foi efectuada por um fornecedor comercial (PicoScript, Houston TX).

5.3.4 - Clonagem de construções binárias adicionais. Para completar pDAB3295 e pDAB3757 incorporou-se a utilização da tecnologia de clonagem GateWay (n.º de cat. Invitrogen 11791-043 e 12535-019). A tecnologia GateWay utiliza recombinação baseada em fagos lambda específica do local para inserir uma cassete de um gene num vector. Para mais informação consultar *Gateway Technology: A universal Technology to clone DNA sequence for functional analysis and expression in multiple systems*, © 1999-2003, Invitrogen Corp., 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA 92008 (impresso - 2003). Todas as outras construções criadas para transformação em espécies de plantas adequadas foram construídas utilizando procedimentos semelhantes aos anteriores e outros métodos padrão de clonagem molecular (Maniatis et al., 1982). A **tabela 14** apresenta uma lista de todas as construções de transformação utilizadas com

promotores adequados e características definidas, bem como transformadas em culturas.

Adicionou-se o gene *sacB* ao vector binário pDAB3289 na forma de um marcador de selecção negativo bacteriano para reduzir a persistência de *Agrobacterium* associada a tecido vegetal transformado. SacB é uma enzima levana-sacarase produzida por *Bacillus* spp. e é tóxica para a maioria das bactérias Gram-negativas quando cultivadas na presença de sacarose (Gay *et al.*, 1983). O gene *sacB* foi recuperado de um fragmento *Hind* III do plasmídeo pRE112 (Edwards, *et al.*, 1998) e clonado no local *Hind* III único em pDAB3289.

Tabela 14. Construções binárias utilizadas na transformação de várias espécies de plantas.

N.º pDAB	N.º pDAS	Espécies* transformadas em	Gene de interesse (GOI)	Promotor	Região 1	Região 2	GOI 2	Promotor	Gene de selecção bacteriano	Seleccção bacteriana no gene 2	Gene de selecção de planta	Promotor	Método de transformação
721		A, T, Ct, S, Ca	AAD1 v3	AtUbi10	NtOsm	-	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Agro binário
3230		A	EPSPS	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomomicina	-	AAD1 v3	CsVMV	Agro binário
3289		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomomicina	sacB	HptII	AtUbi3	Agro binário
3291		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomomicina	-	HptII	AtUbi3	Agro binário
3295		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomomicina	-	pat	AtUbi10	Feixe de aerossol
3297	1270	A, T	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomomicina	-	pat	AtUbi10	Agro binário
3403		Cn, R	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	Mesmo que GOI		Fios ("Whiskers") / Pistola
3404		Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	pat	OsAct1	Fios ("Whiskers")
3415	1283	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	AHAS v3	OsAct1	Fios ("Whiskers")
3602	1421	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomomicina	-	AHAS v3	OsAct1	Agro superbinário
3757		Ca	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomomicina	-	pat	AtUbi11	Agro binário
3705		A	AAD2 v2	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Agro binário

*A = *Arabidopsis* CsVMV=Promotor de vírus do mosaico das nervuras de mandioca
T = Tabaco AtUbi10=Promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana*
S = Soja RB7 Mar v2 = região associada a matriz de *Nicotiana tabacum* (MAR)
Ct = Algodão Nt Osm = Região não traduzida a 5' de osmotina de *Nicotiana tabacum* e região não traduzida a 3' de osmotina de *Nicotiana tabacum*
R = Arroz
Cn = Milho (721 e 793) AtU ORF1 3' UTR = Região não traduzida a 3' do quadro de leitura aberta 1 de *Agrobacterium tumefaciens*
Ca = Colza (3295 e 3757) AtU ORF24 3' UTR = Região não traduzida a 3' do quadro de leitura aberta 24 de *Agrobacterium tumefaciens*
ZmUbi1 = promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*
Hpt11 = higromicina-fosfotransferase

Exemplo 6 - Transformação em *Arabidopsis* e selecção

6.1-Condições de cultura de *Arabidopsis thaliana*.

Suspenderam-se sementes de *Arabidopsis* de tipo selvagem numa solução de agarose a 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Armazenaram-se as sementes em suspensão a 4°C durante 2 dias para completar os requisitos de dormência e assegurar uma germinação síncrona das sementes (estratificação).

Cobriu-se a mistura Sunshine LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) com vermiculite fina e sub-irrigou-se com solução de Hoagland até estar molhado. Deixou-se drenar a mistura de solo durante 24 horas. Semearam-se as sementes estratificadas na vermiculite e cobriram-se com coberturas de humidade (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 dias.

Germinaram-se as sementes e cultivaram-se as plantas num Conviron (modelos CMP4030 e CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) em condições de dia longo (16 horas de luz/8 horas de escuro) a uma intensidade de luz de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ a temperatura constante (22°C) e humidade (40-50%). As plantas foram regadas inicialmente com solução de Hoagland e subsequentemente com água desionizada para manter o solo húmido mas não molhado.

6.2 - Transformação em *Agrobacterium*.

Utilizou-se uma placa de LB + ágar-ágar com eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200 mg/L) ou espectinomicina (100 mg/L) contendo uma colónia riscada de DH5 α para obter uma colónia para inocular 4 ml de culturas mini prep (LB líquido + eritromicina). Incubaram-se as culturas durante a noite a 37°C com agitação constante. Utilizaram-se Spin Mini Preps de Qiagen (Valencia, CA), para purificar o ADN plasmídico segundo as instruções do fabricante.

Prepararam-se células de *Agrobacterium tumefaciens* (estirpes Z707s, EHA101s e LBA4404s) electrocompetentes utilizando um protocolo de Weigel e Glazebrook (2002). Transformaram-se as células competentes de *Agrobacterium* utilizando um método de electroporação adaptado de Weigel e Glazebrook (2002). Descongelaram-se 50 µl de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* em gelo e adicionou-se 10-25 ng do plasmídeo pretendido às células. Adicionou-se a mistura de ADN e células a cuvetes de electroporação pré-arrefecidas (2 mm). Utilizou-se um electroporador Eppendorf 2510 para a transformação nas seguintes condições, voltagem: 2,4 kV, duração do impulso: 5 ms.

Após electroporação adicionou-se 1 ml de meio YEP (por litro: 10 g de extracto de levedura, 10 g de bactopectona, 5 g de NaCl) à cuvette e transferiu-se a suspensão celular em YEP para um tubo de cultura de 15 ml. Incubaram-se as células a 28°C num banho de água com agitação constante durante 4 horas. Após incubação, plaqueou-se a cultura YEP + ágar-ágar com eritromicina (200 mg/L) ou espectinomicina (100 mg/L) e estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/L). Incubaram-se as placas durante 2-4 dias a 28°C.

Seleccionaram-se colónias e utilizaram-se para riscar placas frescas de YEP + ágar-ágar com eritromicina (200 mg/L) ou espectinomicina (100 mg/L) e estreptomicina (250 mg/L) e incubaram-se a 28°C durante 1-3 dias. Seleccionaram-se colónias para análise por PCR para verificar a presença da inserção de gene usando iniciadores específicos de vector. Utilizaram-se Spin Mini Preps de Qiagen, efectuadas segundo as instruções do fabricante, para purificar o ADN plasmídico de colónias seleccionadas de *Agrobacterium* com a seguinte excepção: utilizaram-se alíquotas de 4 ml de uma cultura miniprep durante a noite de 15 ml (YEP líquido + eritromicina (200 mg/L) ou espectinomicina (100 mg/L)) e estreptomicina (250 mg/L) para a purificação de ADN. Uma alternativa à utilização de Qiagen Spin Mini Prep de ADN foi lisar as células de *Agrobacterium* transformadas, suspenderam-se em

10 µl de água, a 100°C durante 5 minutos. Incluiu-se ADN plasmídico do vector binário utilizado na transformação de *Agrobacterium* como controlo. Completou-se a reacção de PCR utilizando Taq ADN-polimerase de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) seguindo as instruções do fabricante a concentrações 0,5x. As reacções de PCR foram efectuadas num termociclador MJ Research Peltier programado para as seguintes condições; 1) 94°C durante 3 minutos, 2) 94°C durante 45 segundos, 3) 55°C durante 30 segundos, 4) 72°C durante 1 minuto, durante 29 ciclos, seguidamente 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos. A reacção foi mantida a 4°C após os ciclos. A amplificação foi analisada por electroforese em gel de agarose a 1% e visualizou-se com coloração com brometo de etídio. Seleccionou-se uma colónia cujo produto de PCR foi idêntico ao controlo de plasmídeo.

6.3 - Transformação em *Arabidopsis*.

Transformou-se *Arabidopsis* utilizando o método de imersão das inflorescências ("floral dip"). A colónia seleccionada foi utilizada para inocular uma ou mais pré-culturas de 15-30 ml de meio YEP contendo eritromicina (200 mg/L) ou espectinomicina (100 mg/L) e estreptomomicina (250 mg/L). Incubaram-se as culturas durante a noite a 28°C com agitação constante a 220 rpm. Utilizou-se cada pré-cultura para inocular duas culturas de 500 ml de meio YEP contendo eritromicina (200 mg/L) ou espectinomicina (100 mg/L) e estreptomomicina (250 mg/L) e incubaram-se as culturas durante a noite a 28°C com agitação constante. As células foram então sedimentadas a aproximadamente 8700x g durante 10 minutos à temperatura ambiente e rejeitou-se o sobrenadante resultante. Ressuspendeu-se suavemente o sedimento celular em 500 ml de meio de infiltração contendo: 1/2x sais de Murashige e Skoog/ vitaminas B5 de Gamborg, sacarose a 10% (p/v), benzilaminopurina 0,044 µM (10 µl/litro de uma solução mãe 1 mg/ml em DMSO) e Silwet L-77 a 300 µl/litro. Imergiram-se plantas com aproximadamente 1 mês de idade em meio durante 15 segundos, assegurando a submersão das inflorescências mais novas. As plantas foram então deitadas de lado e cobertas

(transparentes ou opacas) durante 24 horas, seguidamente lavaram-se com água e colocaram-se na vertical. Cultivaram-se as plantas a 22°C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro. Aproximadamente 4 semanas após a imersão, colheram-se as sementes.

6.4 - Selecção de plantas transformadas.

Deixaram-se secar sementes T_1 colhidas de fresco (transformadas com gene nativo [AAD-1 (v2)] ou optimizado para plantas [AAD-1 (v3)]) durante 7 dias à temperatura ambiente. Semearam-se as sementes T_1 em tabuleiros de germinação de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), cada recebendo uma alíquota de 200 mg de sementes T_1 estratificadas (~10 000 sementes) que tinham sido previamente suspensas em 40 ml de solução de agarose a 0,1% e armazenadas a 4°C durante 2 dias para completar os requisitos de dormência e assegurar germinação síncrona das sementes.

Cobriu-se a mistura Sunshine LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) com vermiculite fina e subirrigou-se com solução de Hoagland até ficar molhada, seguidamente deixou-se drenar por gravidade. Semeou-se cada alíquota de 40 ml de sementes estratificadas homogeneamente na vermiculite com uma pipeta e cobriram-se com coberturas de humidade (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 dias. As coberturas foram removidas 1 dia antes da selecção inicial de produtos de transformação utilizando pulverização pós-emergência de glufosinato (que selecciona o gene *PAT* co-transformado).

Cinco a seis dias após plantação (DAP) e novamente 10 DAP, pulverizaram-se as plantas T_1 (cotiledóneas e estágio de 2-4 folhas, respectivamente) com uma solução de herbicida Liberty a 0,2% (200 g ae/L de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a um volume de pulverização de 10 ml/tabuleiro (703 L/ha) utilizando uma ponta de pulverização de ar comprimido DeVilbiss para entrega de uma taxa efectiva de 280 g ae/ha de glufosinato por aplicação.

Identificaram-se os sobreviventes (plantas com crescimento activo) 5-7 dias após a pulverização final e transplantaram-se individualmente para vasos de 3 polegadas preparados com meio de vaso (Metro Mix 360). Cobriram-se as plantas transplantadas com coberturas de humidade durante 3-4 dias e colocaram-se numa câmara de cultura a 22°C, tal como anteriormente. As coberturas foram removidas subsequentemente e mudaram-se as plantas para uma estufa (22±5°C, 50±30% HR, 14 h luz:10 escuro, mínimo de 500 µE/m²s¹ luz natural + suplementar) pelo menos 1 dia antes de ensaio para a capacidade de AAD-1 (v3) (gene optimizado para plantas) ou AAD-1 (v2) (gene microbiano nativo) proporcionarem resistência a herbicida fenoxiauxínico.

Foi confirmada a expressão da proteína PAT nas plantas T₁ individuais seleccionadas anteriormente aleatoriamente para resistência a glufosinato, utilizando um kit de ELISA para PAT (n.º 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE) para confirmar não destrutivamente a fidelidade do processo de selecção (protocolo do fabricante). As plantas foram então atribuídas aleatoriamente a várias taxas de herbicidas fenoxi (diclorprop ou 2,4-D). As taxas de fenoxi aplicadas inicialmente foram 2,4-D a 12,5 g ae/ha e diclorprop a 50 ou 200 g ae/ha. GR₉₉ para *Arabidopsis* é cerca de 2,4-D a 50 g ae/ha e diclorprop a 200 g ae/ha. Aplicaram-se taxas elevadas em ensaios subsequentes (50, 200, 800 ou 3200 g ae/ha).

Todas as aplicações de herbicida auxínico foram efectuadas utilizando o pulverizador DeVilbiss, tal como descrito anteriormente, para aplicar 703 L/ha de volume de pulverização (0,4 ml de solução/vaso de 3 polegadas) ou aplicado por motopulverizador um volume de pulverização de 187 L/ha. Utilizou-se 2,4-D de grau técnico (Sigma, St. Louis, MO) dissolvido em DMSO e diluído em água (DMSO <1% de concentração final) ou a formulação comercial de sal de dimetilamina (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). O diclorprop utilizado foi de grau técnico (Sigma, St. Louis, MO) dissolvido em DMSO e diluído em água (DMSO <1% de concentração final). Para taxas de herbicida superiores a 800 g ae/ha, o pH da solução de

pulverização torna-se demasiado ácido, queimando as folhas das plantas de *Arabidopsis* novas e tenras e complicando a avaliação dos efeitos principais dos herbicidas. Tornou-se prática padrão aplicar estas taxas elevadas de herbicidas fenoxi em tampão Tris 200 mM (pH 9,0) para um pH final de ~7-8.

Alguns indivíduos T₁ foram sujeitos a herbicidas comerciais alternativos em vez de uma fenoxiauxina. Um ponto de interesse foi determinar se haloxifop podia ser degradado eficazmente na planta.

Embora *Arabidopsis*, sendo uma dicotiledónea, não seja um sistema óptimo para ensaios de inibição de ACCase por herbicidas gramíneas AOPP, sujeitaram-se plantas T₁ transformadas com *AAD-1 (v3)* em taxas elevadas (400-1600 g ae/ha) de ácido RS-haloxifop (sintetizado internamente) que causa anomalias de crescimento e morte em *Arabidopsis* de tipo selvagem, utilizando o pulverizador DeVilbiss, tal como descrito anteriormente. Efectuou-se classificação das lesões 7 e 14 dias após tratamento. De igual modo, trataram-se indivíduos T₁ com o herbicida auxínico piridiloxiacetato, fluroxipir.

6.5 - Resultados de selecção de plantas transformadas.

As primeiras transformações de *Arabidopsis* foram efectuadas utilizando *AAD-1 (v3)* (gene optimizado para plantas). Os produtos de transformação T₁ foram primeiro seleccionados das restantes sementes não transformadas utilizando um esquema de selecção de glufosinato. Rastream-se mais de 400 000 sementes T₁ e identificaram-se 493 plantas resistentes a glufosinato (gene PAT), o que resulta numa frequência de transformação/selecção de 0,12%. Dependendo do lote de sementes ensaiado, tal estava na gama de 0,05-0,23% (consultar a **tabela 15**). Também se seleccionou um pequeno lote de sementes transformadas com *AAD-1 (v2)* (nativo) utilizando o agente de selecção glufosinato. Identificaram-se duzentos e setenta e oito indivíduos T₁ resistentes a glufosinato entre

as 84 000 sementes rastreadas (frequência de transformação/selecção de 0,33%).

Tabela 15: Selecção de plantas T₁ individuais transformadas com AAD-1 (v3) (optimizado para plantas) ou AAD-1 (v2) (nativo), AAD-2 (v1) (nativo) ou AAD-2 (v2) optimizado para plantas utilizando glufosinato e 2,4-D.

Agente de selecção	Gene	Desvio de codões	Sementes totais semeadas e rastreadas	Número de T ₁ resistentes	Taxa de selecção	Gama de taxas de selecção	% de plantas seleccionadas que expressam PAT3
Glufosinato ¹	AAD-1 (v2)	N	84 000	278	0,33%	0,33%	nd ⁴
Glufosinato ¹	AAD-1 (v3)	P	400 500	493	0,12%	0,05 a 0,23%	97%
2,4-D ²	AAD-1 (v3)	P	70 000	53	0,08%	0,07 a 0,08%	96%
Glufosinato ¹	AAD-2 (v1)	N	1 301 500	228	0,018%	0,007 a 0,021%	100%
Glufosinato ¹	AAD-2 (v2)	P	200 000	224	0,11%	0,11%	nd ⁴

¹Esquema de selecção com glufosinato: 280 g ae/ha de glufosinato aplicado 5-6 + 10 DAP

²Esquema de selecção com 2,4-D: 50 g ae/ha de 2,4-D aplicado 5-7 + 10-14 DAP

³Expressão de proteína PAT determinada por tiras de ELISA de PAT

⁴nd, não determinado

⁵desvio de codões, n=gene microbiano nativo, p=optimizado para plantas

As plantas T₁ seleccionadas anteriormente foram subsequentemente transplantadas para vasos individuais e pulverizadas a várias taxas de herbicidas ariloxialcanoato comerciais. A **tabela 16** compara a resposta de genes AAD-1 (v2) nativo e AAD-1 (v3) optimizado para plantas para conferir resistência a 2,4-D a produtos de transformação T₁ de *Arabidopsis*. Ambos os genes conferiram resistência a plantas T₁ individuais de *Arabidopsis*. Dentro de um determinado tratamento, o nível de resposta da planta variou grandemente e pode ser atribuído ao facto de cada planta representar um evento de transformação independente. É importante notar que a cada taxa de 2,4-D ensaiada, existiram indivíduos que não foram afectados, enquanto outros foram seriamente afectados. Apresenta-se na **tabela 16** uma média de lesões globais da população por taxa, simplesmente para demonstrar a diferença significativa entre as plantas transformadas com AAD-1 (v2) ou AAD-1 (v3) relativamente a controlos de tipo selvagem ou transformados com PAT/Cry1F. Também é evidente que a tolerância parece ser significativamente maior (frequência e nível global de resposta individual) para a sequência

AAD-1 (v3) otimizada para plantas relativamente à sequência nativa *AAD-1* (v2) (consultar **tabela 16**). Aplicaram-se taxas mais elevadas de 2,4-D (até 3 200 g ae/ha) a indivíduos T_1 adicionais que expressam *AAD-1* (v3). Os níveis de lesões tendem a ser maiores e a frequência de plantas altamente resistentes é menor a estas taxas elevadas (6x taxas de campo). Igualmente a estas taxas elevadas, a solução de pulverização torna-se altamente ácida excepto se for tamponada. A *Arabidopsis* cultivada principalmente na câmara de cultura tem uma cutícula muito fina e os efeitos de queimaduras graves podem complicar o ensaio a estas taxas elevadas. No entanto, alguns indivíduos sobreviveram 3200 g ae/ha de 2,4-D com poucas ou nenhuma lesões.

Tabela 16. Resposta de *Arabidopsis* T_1 transformada com *AAD-1* v3 (otimizado para plantas) ou *AAD-1* v2 (nativo) ou *AAD-2* (nativo) a uma gama de taxas de 2,4-D aplicadas pós-emergência. A resposta é apresentada em termos de % de lesões visuais 2 WAT. Os dados são apresentados como um histograma de indivíduos que apresentam lesões pequenas ou nenhuma lesão (<20%), lesões moderadas (20-40%) ou lesões graves (>40%). Dado que cada T_1 é um evento de transformação independente, é de esperar uma variação significativa das respostas individuais de T_1 numa determinada taxa. Apresenta-se a média aritmética e o desvio padrão para cada tratamento. A gama de resposta individual também é indicada na última coluna para cada taxa e transformação. A *Arabidopsis* transformada com *PAT/Cry1F* serviu como controlo transformado sensível a auxina. A *Arabidopsis* de tipo selvagem não é transformada.

Tabela 16. Resposta de *Arabidopsis* T₁ transformada com AAD-1 v3 (otimizado para plantas) ou AAD-1 v2 (nativo) ou AAD-2 (nativo) a uma gama de taxas de 2,4-D aplicadas pós-emergência.

Médias do gene AAD-1 (v2) nativo	% de lesões			Média	Desvio padrão
	<20%	20-40%	>40%		
tampão de controlo não tratado	20	6	7	25,3	34,7
2,4-D a 50 g ae/ha	55	16	9	14,8	22,7
2,4-D a 200 g ae/ha	45	11	24	34,1	39,3
2,4-D a 800 g ae/ha	11	32	37	52,5	34,2
Médias do gene AAD-2 nativo	% de lesões			Média	Desvio padrão
	<20%	20-40%	>40%		
tampão de controlo não tratado	4	1	1	25,0	21,7
2,4-D a 50 g ae/ha	1	2	11	68,2	30,2
2,4-D a 200 g ae/ha	0	3	11	82,7	28,8
2,4-D a 800 g ae/ha	0	0	14	99,8	0,8
Médias do gene AAD-1 (v3) reconstruído	% de lesões			Média	Desvio padrão
	<20%	20-40%	>40%		
tampão de controlo não tratado	9	0	0	0,0	0,0
2,4-D a 50 g ae/ha	10	1	5	24,3	35,9
2,4-D a 200 g ae/ha	11	4	1	14,0	25,9
2,4-D a 800 g ae/ha	11	4	1	14,7	26,1
Médias de tipo selvagem	% de lesões			Média	Desvio padrão
	<20%	20-40%	>40%		
tampão de controlo não tratado	11	0	0	0,0	0,0
2,4-D a 50 g ae/ha	0	0	15	90,0	0,0
2,4-D a 200 g ae/ha	0	0	15	95,1	0,5
2,4-D a 800 g ae/ha	0	0	15	100,0	0,0
Médias de PAT/Cry1F (controlo transformado)	% de lesões			Média	Desvio padrão
	<20%	20-40%	>40%		
tampão de controlo não tratado	11	0	0	0,0	0,0
2,4-D a 50 g ae/ha	0	0	15	90,7	4,2
2,4-D a 200 g ae/ha	0	0	15	97,2	1,7
2,4-D a 800 g ae/ha	0	0	15	100,0	0,0

A **tabela 17** apresenta uma resposta à dose semelhante de *Arabidopsis* T₁ ao ácido fenoxipropiónico, diclorprop.

Verificaram-se tendências semelhantes às de 2,4-D, indicando que a cadeia lateral propiónica quiral serve como um substrato aceitável. Seguidamente determinou-se se se pode conferir um grau aumentado de tolerância a haloxifop a *Arabidopsis* transformada a taxas elevadas de 400 - 1600 g ae/ha (**tabela 18**). A taxa de utilização de campo normal para haloxifop (um herbicida específico de gramíneas) é cerca de 50-70 g ae/ha. As dicotiledóneas são geralmente consideradas naturalmente tolerantes a herbicidas AOPP; no entanto, ocorrem efeitos fisiológicos graves em *Arabidopsis* a estas taxas elevadas. Alguns indivíduos transformados com *AAD1* (v3) apresentaram tolerância aumentada a haloxifop. Tal proporciona os primeiros dados em plantas que *AAD-1* (v3) proporcionará resistência a AOPP. Não se verificou qualquer resistência com fluroxipir (uma piridiloxiacetato auxina) em *Arabidopsis* transformada, consistente com o trabalho *in vitro* utilizando a enzima expressa heterologicamente.

Tabela 17. Resposta de *Arabidopsis* T₁ a uma gama de taxas de diclorprop aplicado pós-emergência. A resposta é apresentada em termos de % de lesões visuais 2 WAT. Os dados são apresentados como um histograma de indivíduos que apresentam lesões pequenas ou nenhuma lesões (<20%), lesões moderadas (20-40%) ou lesões graves (>40%). Dado que T₁ é um evento de transformação independente, é de esperar uma variação significativa das respostas individuais de T₁ numa determinada taxa. Apresenta-se a média aritmética e o desvio padrão para cada tratamento. A gama de resposta individual também é indicada na última coluna para cada taxa e transformação. A *Arabidopsis* transformada com *PAT/Cry1F* serviu como controlo transformado sensível a auxina. A *Arabidopsis* de tipo selvagem não é transformada.

Tabela 17. Resposta de *Arabidopsis* T₁ a uma gama de taxas de diclorprop aplicadas pós-emergência.

Médias do gene AAD-1 (v3)	% de lesões			% de lesões		
	<20%	20-40%	>40%	Média	Desvio padrão	Gama
Controlo não tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
RS-diclorprop a 12,5 g ae/ha	7	1	0	5,0	7,6	0-20
RS-diclorprop a 50 g ae/ha	7	1	0	3,1	8,8	0-25
RS-diclorprop a 200 g ae/ha	4	1	3	40,0	50,1	0-100
RS-diclorprop a 800 g ae/ha	0	5	3	51,9	40,0	20-100

Médias de PAT/Cry1F	% de lesões			% de lesões		
	<20%	20-40%	>40%	Média	Desvio padrão	Gama
Controlo não tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
RS-diclorprop a 12,5 g ae/ha	0	6	2	38,1	25,3	20-95
RS-diclorprop a 50 g ae/ha	0	0	8	80,0	25,3	50-100
RS-diclorprop a 200 g ae/ha	0	0	8	98,3	2,2	95-100
RS-diclorprop a 800 g ae/ha	0	0	8	100,0	0,0	100

Médias de tipo selvagem	% de lesões			% de lesões		
	<20%	20-40%	>40%	Média	Desvio padrão	Gama
Controlo não tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
RS-diclorprop a 12,5 g ae/ha	3	0	2	13,3	2,9	10-15
RS-diclorprop a 50 g ae/ha	0	0	3	53,3	5,8	50-60
RS-diclorprop a 200 g ae/ha	0	0	3	95,0	5,0	90-100
RS-diclorprop a 800 g ae/ha	0	0	3	100,0	0,0	100

Tabela 18. Resposta de *Arabidopsis* T₁ a uma gama de taxas de haloxifop aplicado pós-emergência a taxas artificialmente elevadas na tentativa de demonstrar a tolerância da dicotiledónea *Arabidopsis* ao graminicida. A resposta é apresentada em termos de % de lesões visuais 2 WAT. Os dados são apresentados como um histograma de indivíduos que apresentam lesões pequenas ou nenhuma lesão (<20%), lesões moderadas (20-40%) ou lesões graves (>40%). Dado que cada T₁ é um evento de transformação independente, é de esperar uma variação significativa das respostas individuais de T₁ numa determinada taxa. Apresenta-se a média aritmética e o desvio padrão para cada tratamento. A gama de resposta individual

também é indicada na última coluna para cada taxa e transformação. A *Arabidopsis* transformada com *PAT/Cry1F* serviu como controlo transformado sensível a auxina. A *Arabidopsis* de tipo selvagem não é transformada.

Tabela 18. Resposta de *Arabidopsis* T! a uma gama de taxas de haloxifop aplicadas pós-emergência a taxas artificialmente elevadas na tentativa de demonstrar a tolerância da dicotiledónea *Arabidopsis* ao graminicida.

Médias de AAD-1 (v3)	% de lesões			% de lesões		
	<20%	20-40%	>40%	Média	Desvio padrão	Gama
Controlo não tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 100 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 200 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 400 g ae/ha	3	1	0	6,3	9,5	0-20
haloxifop a 800 g ae/ha	1	1	2	46,3	42,7	0-85
haloxifop a 1600 g ae/ha	1	0	3	65,0	47,3	0-100

Médias de PAT/Cry1F	% de lesões			% de lesões		
	<20%	20-40%	>40%	Média	Desvio padrão	Gama
Controlo não tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 100 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 200 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10
haloxifop a 400 g ae/ha	0	4	0	27,5	5,0	20-30
haloxifop a 800 g ae/ha	0	0	4	78,8	6,3	70-85
haloxifop a 1600 g ae/ha	0	0	4	47,5	43,5	80-100

Médias de tipo selvagem	% de lesões			% de lesões		
	<20%	20-40%	>40%	Média	Desvio padrão	Gama
Controlo não tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 100 g ae/ha	3	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 200 g ae/ha	3	0	0	0,0	0,0	0
haloxifop a 400 g ae/ha	0	3	0	20,0	0,0	20
haloxifop a 800 g ae/ha	0	0	3	73,3	10,4	70-85
haloxifop a 1600 g ae/ha	0	0	3	93,3	11,5	80-100

6.6 - AAD-1 (v3) como um marcador seleccionável.

A capacidade de utilizar AAD-1 (v3) como um marcador seleccionável utilizando 2,4-D como o agente de selecção foi analisada inicialmente em *Arabidopsis* transformada tal como descrito anteriormente. Semearam-se sementes T₁ transformadas com PAT e AAD1 (v3) (pDAB 721) em tabuleiros e germinaram-se tal como descrito anteriormente e compararam-se a semente semelhante tratada com o esquema de selecção normal de glufosinato (5 e 10 DAP). Aplicou-se 2,4-D (50 g ae/ha) a plântulas de *Arabidopsis* tal como previamente efectuado com glufosinato. Ensaaiaram-se variações no número de aplicações e altura da aplicação. Cada tabuleiro de plantas recebeu uma ou duas alturas de aplicação de 2,4-D num dos seguintes esquemas de tratamento: 5+10 DAP, 5+14 DAP, 10 DAP, 10+14 DAP, 14 DAP. Identificaram-se as plantas como resistentes ou sensíveis a 19 DAP e correram-se tiras de ensaio ELISA para determinar a frequência de co-transformação bem-sucedida de um gene PAT activo.

Identificaram-se cinquenta e três entre 70 000 sementes plantadas como resistentes a 2,4-D. Utilizou-se ELISA para rastrear um subconjunto de 44 indivíduos desta população para expressão de proteína PAT. Noventa e seis por cento dos indivíduos foram positivos indicando a presença do gene co-transformado, PAT. O baixo número de resultados de ELISA negativos (4%) está de acordo com uma taxa de erro de 3% em populações de plantas resistentes a glufosinato (**tabela 15**). A eficácia de selecção parece ser algo menor do que com 2,4-D (0,08%) relativamente a glufosinato (0,12%); no entanto, a gama de taxas de selecção ao longo de todas as experiências indicaria que ambos os agentes de selecção são igualmente bons para seleccionar *Arabidopsis* transformada com genes AAD-1 (v3) ou PAT, respectivamente. Duas aplicações sucessivas identificam mais precisamente os indivíduos resistentes a ambos os herbicidas ensaiados.

6.7 - Herdabilidade.

Vários eventos T_1 foram autopolinizados para produzir sementes T_2 . Estas sementes foram a descendência ensaiada por aplicação de 2,4-D (200 g ae/ha) a 100 irmãos T_2 aleatórios. Cada planta T_2 individual foi transplantada para vasos quadrados de 7,5 cm antes de aplicação por pulverização (moto-pulverizador a 187 L/ha de taxa de aplicação). Mais de 60% das famílias T_1 (plantas T_2) segregaram-se no modelo antecipado de 3 resistentes:1 sensível para um local único herdado predominantemente com hereditariedade mendeliana, tal como determinado pelo teste do Qui quadrado ($P > 0,05$).

Colheram-se sementes de 12 a 20 indivíduos T_2 (sementes T_3). Ensaíram-se vinte e cinco irmãos T_3 de cada uma das oitoc famílias T_2 seleccionadas aleatoriamente e foram ensaiadas para descendência, tal como descrito anteriormente. Foram identificadas aproximadamente um terço das famílias T_2 que se antecipavam ser homozigóticas (populações não segregadas) em cada linha ensaiada: com uma frequência na gama de um a quatro entre as oito famílias ensaiadas. Estes dados demonstram que *AAD1 (v3)* é integrado estavelmente e herdado de uma forma mendeliana até pelo menos três gerações.

6.8 - Resistência a herbicida adicional atribuível a AAD-1 em *Arabidopsis*.

A capacidade de *AAD-1 (v3)* proporcionar resistência a outros herbicidas ariloxifenoxialcanoatos em *Arabidopsis* transgénica foi determinada utilizando um ensaio de placa *in vitro* modificado. Esterilizaram-se sementes de *Arabidopsis thaliana* de tipo selvagem, bem como de *Arabidopsis thaliana* contendo o gene optimizado para plantas *AAD-1 (v3)* (plantas homozigóticas T_4 id = PAAD1.315.064) por agitação durante 10 min numa solução de lixívia a 50%. Estas sementes foram então enxaguadas quatro vezes com água estéril para remover a lixívia.

Os ensaios de dose-resposta utilizaram um meio nutritivo (consultar seguidamente) suplementado com várias taxas de compostos de ensaio. Os compostos de ensaio foram adicionados ao meio aquecido (55°C) como soluções concentradas em DMSO. Os poços de controlo tinham a quantidade adequada de DMSO sem qualquer composto adicional. A concentração final de DMSO nunca excedeu 1 % (v/v). Após mistura cuidadosa, adicionou-se um alíquota de 6 mL de meio morno contendo a concentração adequada de composto a cada poço num tabuleiro de cultura de tela de poliestireno de 6 poços de fundo plano (Falcon 353046, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ). Após solidificação do meio, aplicaram-se aproximadamente 20 a 30 sementes de *Arabidopsis* em cima do meio solidificado e colocaram-se os restantes 2 mL de meio por cima das sementes. As placas foram levemente agitadas para dispersar as sementes, taparam-se e deixaram-se arrefecer até o meio estar completamente solidificado. Incubaram-se as placas durante 7 dias a 25°C em iluminação fluorescente contínua (75 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A composição do meio nutritivo foi como descrita no exemplo 2.2 e em Somerville e Orgen (1982).

Avaliação da redução de crescimento. Avaliou-se visualmente a parte apical das plantas *Arabidopsis* cultivadas no meio tratado relativamente à parte apical das plantas cultivadas no meio contendo apenas DMSO. Registaram-se os valores como % de redução de crescimento. As avaliações da inibição de crescimento da raiz das plantas de *Arabidopsis* cultivadas no meio tratado foram conseguidas por extracção cuidadosa das plantas do meio e medindo o comprimento da raiz. Estes comprimentos da raiz foram então comparados com o comprimento da raiz das plantas de controlo para determinar a % de redução de crescimento. Avaliou-se um mínimo de cinco plantas para cada tratamento. Os valores registados são uma média de todas as plantas avaliadas. As concentrações calculadas para atingir um efeito de inibição de 50% (I_{50}) foram determinadas para as raízes e para os rebentos de *Arabidopsis* de tipo selvagem e transformada com AAD-1. As razões entre biotipos resistentes e sensíveis estão incluídas na **tabela 19**. Uma razão >2 para as medições tanto de raiz,

como de rebentos significa geralmente resistência significativa. Quanto maior a razão, maior o nível de resistência. Todas as fenoxiauxinas comerciais apresentaram níveis de resistência significativos, incluindo ácidos oxiacéticos (2,4-D e MCPA), bem como ácidos oxipropiônicos (diclorprop e mecoprop). De facto, a avaliação crónica da raiz mostra que a resistência ao ácido oxipropiónico é mais elevada com AAD-1 (v3) do que para ácidos oxiacéticos, em consistência com as características enzimáticas de AAD-1 (v1). A avaliação de outras auxinas contendo anéis piridina mostrou que AAD-1 (v3) não protegeu eficazmente *Arabidopsis* de herbicidas piridiloxiacetatos, triclopir e fluroxipir, ou do herbicida de ácido picolínico, picloram. A vasta resistência a fenoxiauxina é a primeira relatada em planta. As auxinas alternativas para as quais AAD-1 não protege seriam ferramentas viáveis para o controlo e contenção de culturas comerciais transformadas com AAD-1 ou espécies vegetais experimentais.

Tabela 19. Avaliação de ensaio de placas *in vitro* de resistência cruzada a substrato herbicida conferida por AAD-1 (v3) em *Arabidopsis* T₄ homozigóticas (ARBTH).

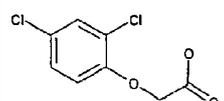
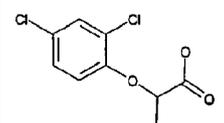
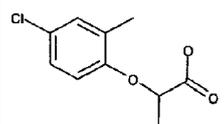
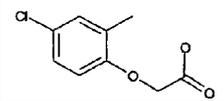
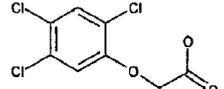
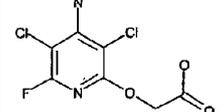
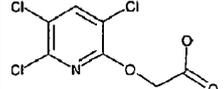
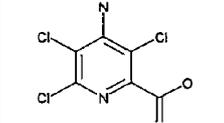
Composto	Estrutura	I50 para rebento ARBTH de tipo selvagem	I50 para rebento PAAD1.31 5.064 T3 ARBTH	I50 para rebento ARBTH de tipo selvagem	I50 para rebento PAAD1.31 5.064 ARBTH	Razão de rebento	Razão de raiz
		Ppm					
Fenoxiauxinas							
2,4-D		0,2	10	< 0,01	0,04	50	>4
diclorprop		2	5	0,01	1,5	2,5	150
Mecoprop		2	25	0,01	1,5	12,5	150
MCPA		0,2	1	0,01	0,03	5	3

Tabela 19. Avaliação de ensaio de placas *in vitro* de resistência cruzada a substrato herbicida conferida por AAD-1 (v3) em *Arabidopsis* T₄ homozigóticas (ARBTH).

Composto	Estrutura	I50 para rebento ARBTH de tipo selvagem	I50 para rebento PAAD1.31 5.064 T3 ARBTH	I50 para rebento ARBTH de tipo selvagem	I50 para rebento PAAD1.31 5.064 ARBTH	Razão de rebento	Razão de raiz
		Ppm					
Fenoxiauxinas							
2,4,5-T		1,5	10	<0,01	<0,01	6,67	NA
Piridinoauxinas							
Fluroxipir		2	1	0,2	0,2	0,5	1
Triclopir		0,2	0,04	0,02	0,02	0,2	1
Picloram		1	0,5	0,3	0,15	0,5	0,5

6.9 - Resistência a aplicações foliares de herbicida em *Arabidopsis* AAD-1.

Determinou-se a capacidade de AAD-1 (v3) proporcionar resistência a outros herbicidas auxínicos ariloxifenoxialcanoatos em *Arabidopsis* transgênica por aplicação foliar dos vários substratos descritos no exemplo 6.8. Estratificou-se geração T₄ de semente de *Arabidopsis*, homozigótica para AAD-1 (v3) (linha AAD1.01.315.076) e semeou-se em tabuleiros de selecção de modo muito semelhante ao de *Arabidopsis* (Exemplo 6.4). Plantou-se uma linha de controlo transformada contendo PAT e o gene Cry1F de resistência a insectos de forma semelhante. Transferiram-se as plântulas para vasos individuais de 3 polegadas na estufa. Pulverizaram-se todas as plantas utilizando um moto-pulverizador a 187 L/ha. As plantas foram pulverizadas com uma gama de herbicidas fenoxiauxínicos: sal de dimetilamina de

2,4-D (DMA) (Riverside Chemicals) 12,5-1600 g ae/ha, mecoprop (AH Marks) 12,5-1600 g ae/ha, R-diclorprop (AH Marks) 50-3200 g ae/ha, 2,4,5-T (grau técnico) 8,75-1120 g ae/ha; herbicidas piridiloxiacetatos triclopir (Dow AgroSciences) 50-3200 g ae/ha e fluroxipir (Dow AgroSciences) 50-3200 g ae/ha; e o metabolito de 2,4-D resultante de actividade AAD-1, 2,4-Diclorofenol (DCP, Sigma) (a 50-3200 g ae/ha, grau técnico). Todas as aplicações foram formuladas em tampão Hepes 200 mM (pH 7,5). Cada tratamento foi replicado 3-4 vezes. As plantas foram avaliadas 3 e 14 dias após tratamento e foram calculadas as médias de duas experiências.

Estes resultados (consultar **tabela 20**) confirmam que AAD-1 (v3) em *Arabidopsis* proporciona resistência robusta a auxinas fenoxiacéticas, auxinas fenoxipropiônicas, mas não mostraram resistência cruzada significativa às auxinas piridiloxiacéticas ensaiadas e corroboram os dados de especificidade de substrato da enzima *in vitro* e de placa completa. Adicionalmente, não há qualquer efeito do metabolito, 2,4-Diclorofenol (DCP), em *Arabidopsis* de tipo selvagem ou transgênica.

Auxinas fenoxipropiônicas		
Tratamento com herbicida	Média da % de lesões 14DAT	
	Plantas AAD1.01.315.076.T ₄ homozigóticas AAD1	Controlo PatCrylf
R-Diclorprop a 50 g ae/ha	3	31
R-Diclorprop a 200 g ae/ha	3	73
R-Diclorprop a 800 g ae/ha	3	89
R-Diclorprop a 3200 g ae/ha	3	95
Mecoprop a 12,5 g ae/ha	3	0
Mecoprop a 25 g ae/ha	0	2
Mecoprop 50 g ae/ha	0	17
Mecoprop a 100 g ae/ha	0	33
Mecoprop a 200 g ae/ha	3	62
Mecoprop a 400 g ae/ha	0	78
Mecoprop a 800 g ae/ha	0	93
Mecoprop a 1600 g ae/ha	0	100

Tabela 20. Comparação da resposta de plantas de *Arabidopsis* T₄ AAD-1 (v3) homozigóticas e de tipo selvagem a vários herbicidas auxínicos com aplicação foliar.

Auxinas fenoxipropiónicas		
Tratamento com herbicida	Média da % de lesões 14DAT	
	Plantas AAD1.01.315.076.T ₄ homozigóticas AAD1	Controlo PatCrylf
Auxinas fenoxiacéticas		
Tratamento com herbicida	Média da % de lesões 14DAT	
	Plantas AAD1.01.315.076.T ₄ homozigóticas AAD1	Controlo PatCrylf
2,4-D DMA a 12,5 g ae/ha	0	67
2,4-D DMA a 25 g ae/ha	0	78
2,4-D DMA a 50 g ae/ha	0	93
2,4-D DMA a 100 g ae/ha	0	100
2,4-D DMA a 200 g ae/ha	0	100
2,4-D DMA a 400 g ae/ha	0	100
2,4-D DMA a 800 g ae/ha	0	100
2,4-D DMA a 1600 g ae/ha	0	100
2,4,5-T a 8,75 g ae/ha	0	0
2,4,5-T a 17,5 g ae/ha	3	20
2,4,5-T a 35 g ae/ha	0	43
2,4,5-T a 70 g ae/ha	3	85
2,4,5-T a 140 g ae/ha	0	95
2,4,5-T a 280 g ae/ha	0	98
2,4,5-T a 560 g ae/ha	17	100
2,4,5-T a 1120 g ae/ha	3	100
Auxinas piridiloxiacéticas		
Tratamento com herbicida	Média da % de lesões 14DAT	
	Plantas AAD1.01.315.076.T ₄ homozigóticas AAD1	Controlo PatCrylf
Triclopir a 50 g ae/ha	31	36
Triclopir a 200 g ae/ha	58	65
Triclopir a 800 g ae/ha	74	84
Triclopir a 3200 g ae/ha	97	95
Fluroxipir a 50 g ae/ha	48	76
Fluroxipir a 200 g ae/ha	75	85
Fluroxipir a 800 g ae/ha	88	85
Fluroxipir a 3200 g ae/ha	95	95
Metabolito DCP inactivo		
2,4-DCP a 50 g ae/ha	0	0

Tabela 20. Comparação da resposta de plantas de *Arabidopsis* T₄ AAD-1 (v3) homozigóticas e de tipo selvagem a vários herbicidas auxínicos com aplicação foliar.

Auxinas fenoxipropiônicas		
Tratamento com herbicida	Média da % de lesões 14DAT	
	Plantas AAD1.01.315.076.T ₄ homozigóticas AAD1	Controlo PatCrylf
2,4-DCP a 200 g ae/ha	0	0
2,4-DCP a 800 g ae/ha	0	0
2,4-DCP a 3200 g ae/ha	0	0

6.10 - Relação entre crescimento da planta e expressão de AAD-1 (v3) em *Arabidopsis*.

Concebeu-se uma experiência para analisar se o nível de expressão de AAD-1 (v3) em *Arabidopsis* varia em diferentes estágios de crescimento. Cultivou-se em estufa uma linha AAD-1 (v3) T₄ homozigótica (id=PAAD1.01.345.163) de elevada tolerância. Metade das plantas foram tratadas com 2,4-D a 800 g ae/ha (tal como previamente descrito) enquanto a outra metade não foi tratada. Colheram-se duas folhas, a 3^a folha a contar do topo e a 5^a folha a contar da base, de 5 plantas, tanto tratadas, como não tratadas, e analisaram-se por experiências de ELISA e transferência "Western" (tal como descrito no exemplo 11) em 4, 10, 14, 20 e 25 DAT. As **figuras 8A** e **8B** mostram que não houve qualquer diferença estatística na expressão de AAD-1 (v3) entre folhas novas e velhas. Além disso, o herbicida 2,4-D teve pouco impacto no nível de expressão da proteína AAD-1 (v3). Os níveis de proteína acumularam em plantas mais velhas com alguma degradação de proteína significativa nos pontos temporais mais tardios.

Numa experiência independente, pulverizaram-se quatro linhas diferentes de *Arabidopsis* T₄ homozigóticas, que apresentam um nível de tolerância diferente ao herbicida 2,4-D, com vários níveis (0, 200, 800 e 3200 g/ha) de 2,4-D e analisaram-se as lesões por herbicida e a expressão de AAD-1 (v3). Quatro dias após o tratamento com herbicida,

observaram-se poucas lesões em três das quatro linhas, mesmo à dose mais elevada ensaiada (**figura 9A**). Estas plantas também expressaram um nível elevado de AAD-1 (v3), de 0,1 a 0,25% (**figura 9B**). Pelo contrário, a linha de baixa tolerância expressou menos de 0,1% de AAD-1 (v3) em TSP e sofreu lesões observáveis. Mais importante, recuperaram das lesões em 14 DAT (**figura 9A**), indicando que o baixo nível de expressão de AAD-1 (v3) foi capaz de proteger as plantas de lesões graves por herbicida. Todas as plantas de controlo sofreram lesões graves e morreram a 14 DAT a doses de 2,4-D de 800 g ae/ha e superiores.

6.11 - Análise molecular de *Arabidopsis* AAD-1 (v3).

Efectuou-se o ensaio "Invader" (métodos dos procedimentos do kit "Third Wave Agbio") para o número de cópias do gene PAT e/ou análise de transferência "Southern" com ADN total obtido do kit Qiagen DNeasy em várias linhas AAD-1 (v3) homozigóticas para determinar integração estável da unidade de transformação da planta contendo PAT e AAD-1 (v3). A análise assumiu ligação física directa destes genes dado que eles estão contidos no mesmo plasmídeo.

Para análise "Southern", sujeitou-se um total de 1 µg de ADN a uma digestão durante a noite com Nsi I para pDAB13721 para obter dados de integração. As amostras foram corridas num gel de agarose a 0,85 % grande durante a noite a 40 volts. O gel foi então desnaturado em NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. O gel foi então neutralizado em Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M pH de 7,5 durante 30 minutos. Preparou-se então um aparelho de gel contendo SSC 20x para obter um gel de gravidade para transferência para membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante a noite. Após a transferência durante a noite, a membrana foi então sujeita a luz UV através de um reticulador (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. A membrana foi então lavada em SDS a 0,1%, SSC 0,1x durante 45 minutos. Após a lavagem de 45 minutos, a membrana foi incubada durante 3 horas a 80°C e seguidamente armazenou-se a 4°C até hibridação. O fragmento molde de

hibridação consistiu dos iniciadores preparados (Pat 5-3 AGATACCCTTGGTTGGTTGC) (SEQ ID NO:23) e (Pat 3-3 CAGATGGATCGTTTGAAGG) (SEQ ID NO:24) concebidos para obter a região de codificação de *PAT*. O produto foi então corrido num gel de agarose a 1% e excisado e seguidamente o gel foi extraído utilizando o procedimento de extracção de gel de Qiagen (28706). A membrana foi então sujeita a uma etapa de pré-hibridação a 60°C durante 1 hora em tampão Perfect Hyb (Sigma H7033). Utilizou-se o procedimento da reacção de marcação com dCTP Prime it RmT (Stratagene 300392) para revelar a sonda baseada em p32 (Perkin Elmer). Limpou-se a sonda utilizando colunas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Utilizaram-se dois milhões de contagens CPM por ml de tampão Perfect Hyb para hibridar as transferências "southern" durante a noite. Após a hibridação durante a noite, sujeitaram-se as transferências a duas lavagens de 20 minutos a 65°C em SDS a 0,1%, SSC 0,1x. As transferências foram então expostas a película durante a noite, incubando a -80°C.

Os resultados demonstraram que todas as plantas resistentes a 2,4-D ensaiadas continham *PAT* (e assim consequentemente *AAD-1 (v3)*). A análise dos números de cópias demonstrou que o total de inserções estava na gama de 1 a >10 cópias. Tal correlaciona-se também com os dados de expressão de proteína *AAD-1 (V3)* indicando que a presença da enzima proporciona níveis significativamente elevados de resistência (>>200 vezes) a todos os ácidos fenoxiacéticos e fenoxipropiónicos disponíveis comercialmente.

6.12 - *Arabidopsis* transformada com junção molecular de *AAD-1 (v3)* e gene de resistência a glifosato.

Produziu-se semente de *Arabidopsis T₁*, tal como descrito previamente, contendo plasmídeo pDAB3230 (*AAD-1 (v3)* + *EPSPS*) que codifica uma suposta característica de resistência a glifosato. Seleccionaram-se os produtos de transformação *T₁* utilizando *AAD-1 (v3)* como o marcador seleccionável, tal como descrito no exemplo 6.6, excepto na taxa de 2,4-D utilizada que foi de 75 g ae/ha. Recuperaram-se vinte e quatro eventos

T₁ transformados individualmente da primeira tentativa de selecção e transferiram-se para vasos de três polegadas na estufa, tal como descrito anteriormente. Ensaaiaram-se três linhas de controlo de *Arabidopsis* diferentes: Columbia-0 de tipo selvagem, linha AAD-1 (v3) + PAT T5 homozigótica (transformada com pDAB721) e linha PAT + Cry1F homozigótica (controlo transformado). Pré-seleccionaram-se apenas plantas pDAB3230 no estágio de plântula para tolerância a 2,4-D. Quatro dias após transplante, as plantas foram divididas igualmente por tratamento foliar por moto-pulverizador, tal como previamente descrito, com glifosato a 0, 26,25, 105, 420, ou 1680 g ae/ha (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) em tampão Hepes 200 mM (pH 7,5). Todos os tratamentos foram replicados 4 ou 5 vezes. As plantas foram avaliadas 7 e 14 dias após tratamento. Calcularam-se os valores de I₅₀ e verificou-se que o nível de tolerância proporcionado por EPSPS em junção molecular com AAD-1 (v3) foi >14 vezes (consultar a **figura 10**). AAD-1 (v3) não proporcionou por si só resistência a glifosato (relativo a resposta a pDAB721). Estas plantas T₁ serão cultivadas até se obterem sementes e autopolinizadas para obter sementes T₂. As plantas T₁ pDAB 3230 demonstraram tolerância a doses letais de 2,4-D e glifosato. As plantas T₂ serão ensaiadas adicionalmente para demonstrar que estas plantas co-transformadas resistem a tratamentos de glifosato + 2,4-D aplicados em mistura em tanque, tal como descrito no exemplo 21 e apresentado para milho transformado com AAD-1 (v3) no exemplo 8.

Exemplo 7 - Transformação de milho mediada por fios ("WHISKERS") e utilização de AAD-1 (v3) como um marcador seleccionável

7.1- Clonagem de AAD-1 (v3).

Obteve-se o fragmento AAD-1 (v3) de um fragmento NcoI/SacI. Digeriu-se a construção pDAB4005 com NcoI e SacI e isolou-se o fragmento de esqueleto de 5175 pb. Ligaram-se conjuntamente os dois fragmentos utilizando ADN-ligase de T4 e transformaram-se em células DH5 α . Efectuaram-se

minipreparações nas colónias resultantes utilizando o kit QIA Spin mini prep da Qiagen e digeriram-se as colónias para verificar a orientação. O plasmídeo intermediário correcto foi denominado pDAB3403. Digeriram-se pDAB3403 e pDAB8505 (OsAct1/PAT/ZmLip) com NotI. Isolou-se e purificou-se a banda de 3442 pb de pDAB3403 e a banda de 11017 pb de pDAB8505. Ligaram-se conjuntamente os fragmentos, transformaram-se para DH5 α e rastrearam-se os plasmídeos resultantes para orientação. A construção final foi denominada pDAB3404, que contém ZmUbil1/po-aad1/ZmPer5::OsAct1/PAT/ZmLip.

7.2 - Iniciação de calo/suspensão.

Para obter embriões imaturos para iniciação de cultura de calo, efectuaram-se cruzamentos F₁ entre parentes A e B Hi-II cultivados em estufa (Armstrong *et al.* 1991). Quando os embriões atingiram 1,0-1,2 mm de tamanho (aproximadamente 9-10 dias após-polinização), colheram-se as espigas e esterilizou-se a superfície esfregando com detergente Liqui-Nox®, imersão em etanol a 70% durante 2-3 minutos, seguidamente imersão em lixívia comercial a 20% (hipoclorito de sódio a 0,1%) durante 30 minutos.

Enxaguaram-se as espigas em água destilada, estéril e excisaram-se assepticamente os embriões zigóticos imaturos e cultivaram-se em meio 15Ag10 (meio N6 (Chu *et al.*, 1975), 2,4-D a 1,0 mg/L, sacarose a 20 g/L, hidrolisado de caseína (digestão enzimática) a 100 mg/L, L-prolina 25 mM, AgNO₃ 10 mg/L, Gelrite a 2,5 g/L, pH 5,8) durante 2-3 semanas com o escutelo virado para fora do meio. Transferiu-se selectivamente o tecido que apresenta a morfologia adequada (Welter *et al.*, 1995) em intervalos de duas semanas para meio 15Ag10 fresco durante cerca de 6 semanas, seguidamente transferiram-se para meio 4 (meio N6, 2,4-D a 1,0 mg/L, sacarose a 20 g/L, hidrolisado de caseína (digestão enzimática) a 100 mg/L, L-prolina 6 mM, Gelrite a 2,5 g/L, pH 5,8) a intervalos de duas semanas durante aproximadamente 2 meses.

Para iniciar as culturas embriogénicas em suspensão, adicionou-se aproximadamente 3 ml de volume celular empacotado (PCV) de tecido de calo originário de um único embrião a aproximadamente 30 ml de meio líquido H9CP+ (mistura salina basal MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas MS modificadas contendo 10 vezes menos ácido nicotínico e 5 vezes mais tiamina-HCl, 2,4-D a 2,0 mg/L, ácido α -naftalenoacético (NAA) a 2,0 mg/L, sacarose a 30 g/L, hidrolisado de caseína (digestão ácida) a 200 mg/L, mio-inositol a 100 mg/L, L-prolina 6 mM, água de coco a 5% v/v (adicionada imediatamente antes de subcultura), pH 6,0). As culturas em suspensão foram mantidas em condições de escuro em matrizes Erlenmeyer de 125 ml num agitador com temperatura controlada a 125 rpm, a 28°C. Tipicamente estabeleceram-se linhas celulares no intervalo de 2 a 3 meses após iniciação. Durante o estabelecimento, as suspensões foram sub-cultivadas de 3,5 em 3,5 dias por adição de 3 ml de PCV de células e 7 ml de meio condicionado a 20 ml de meio líquido H9CP+ fresco utilizando uma pipeta de ponta larga. Quando o tecido começou a duplicar de tamanho, aumentou-se a escala das suspensões e mantiveram-se em matrizes de 500 ml para os quais se transferiu 12 ml de PCV de células e 28 ml de meio condicionado para 80 ml de meio H9CP+. Quando as suspensões estavam completamente estabelecidas, foram crio-conservadas para uso futuro.

7.3 - Crio-conservação e descongelamento de suspensões.

Dois dias após subcultura, adicionou-se 4 ml de PCV de células em suspensão e 4 ml de meio condicionado a 8 ml de crio-protector (dissolvido em meio H9CP+ sem água de coco, glicerol 1 M, DMSO 1 M, sacarose 2 M, esterilizado por filtração) e deixou-se a agitar a 125 rpm a 4°C durante 1 hora num matraz de 125 ml. Após 1 hora, adicionou-se 4,5 ml a um frasquinho de congelamento Corning de 5,0 ml arrefecido. Depois de encher os frasquinhos individuais, mantiveram-se durante 15 minutos a 4°C num congelador de velocidade controlada, seguidamente deixaram-se congelar a uma velocidade de -0,5°C/minuto até atingir a temperatura final de -40°C.

Após atingir a temperatura final, transferiram-se os frasquinhos para caixas dentro de prateleiras dentro de uma unidade de armazenamento Cryoplus 4 (Forma Scientific) cheia com vapor de azoto líquido.

Para descongelar, removeram-se os frasquinhos da unidade de armazenamento e colocaram-se num recipiente de gelo seco fechado, seguidamente mergulharam-se num banho de água mantido a 40-45°C até parar o borbulhamento. Depois de descongelados, despejou-se o conteúdo para uma pilha de ~8 papéis de filtro Whatman de 70 mm (N.º 4) estéreis em placas de Petri de 100x25 mm cobertas. Deixou-se absorver o líquido pelos filtros durante vários minutos, seguidamente transferiu-se o filtro do topo que continha as células para meio GN6 (meio N6, 2,4-D a 2,0 mg/L, sacarose a 30 g/L, Gelrite a 2,5 g/L, pH 5,8) durante 1 semana. Após 1 semana, transferiu-se apenas o tecido com morfologia promissora do papel de filtro directamente para meio GN6 fresco. Este tecido foi subcultivado em intervalos de 7-14 dias até se encontrarem disponíveis 1 a 3 gramas para iniciação de suspensão em aproximadamente 30 mL de meio H9CP+ em matrizes Erlenmeyer de 125 ml. Subcultivaram-se três mililitros de PCV para meio H9CP+ fresco de 3,5 em 3,5 dias até se obter um total de 12 ml de PCV, altura em que se fez subcultura tal como anteriormente descrito.

7.4 - Dose-resposta de tecido não transformado a ácido haloxifop.

Puseram-se conjuntamente linhas celulares Hi-II dadoras não transformadas, tratadas com fios ("WHISKERS") sem ADN, filtradas para meio GN6 a uma velocidade de 6 ml por filtro e deixaram-se formar calo durante 2-3 semanas a 28°C. Transferiu-se aproximadamente 200 mg de tecido em suspensão em calo por tratamento para meio de selecção em placas de 60x20 mm contendo ácido R-haloxifop 30, 100 ou 300 nM. Utilizaram-se três réplicas por concentração. Incluiu-se também um meio de controlo contendo bialafos a 1 mg/L (formulação comercial Herbiace, Meiji Seika, Japão), GN6 (1H) para comparação. Removeu-se o calo após 2 semanas, pesaram-se

e transferiram-se para meio fresco da mesma concentração durante mais 2 semanas. Após terem passado um total de 4 semanas, removeu-se o tecido, pesou-se ao tempo final e seguidamente rejeitou-se. Os resultados apresentam-se na **figura 11**.

Efectuaram-se também dois estudos de dose-resposta independentes de tecido de calo aos produtos de degradação de fenol de haloxifop e ci-halofop, respectivamente, para confirmar que este produto final não é prejudicial ao crescimento de calo. Os dados de dose-resposta de fenol de ci-halofop (consultar a **figura 12**) demonstram que para fenol de ci-halofop 1 μM , o crescimento é ainda 76% o do controlo sem fenol de ci-halofop. Os dados de dose-resposta de fenol de haloxifop demonstram que mesmo para fenol de haloxifop 300 nM, o crescimento foi igual ou superior ao controlo sem fenol de haloxifop (dados não apresentados).

7.5 - Transformação mediada por fios ("WHISKERS") utilizando selecção com bialafos.

Aproximadamente 24 horas antes de transformação, subcultivou-se 12 ml de PCV de células embriogénicas de milho em suspensão previamente crio-conservadas mais 28 ml de meio condicionado para 80 ml de meio líquido GN6 (meio líquido GN6 sem Gelrite) num matraz Erlenmeyer de 500 ml e colocou-se num agitador a 125 rpm, a 28°C. Repetiu-se isto 2 vezes utilizando a mesma linha celular, de modo que se distribuiu um total de 36 ml de PCV para 3 matrizes. Após 24 horas, removeu-se o meio líquido GN6 e substituiu-se por 72 ml de meio osmótico GN6 S/M (meio N6, 2,4-D a 2,0 mg/L, sacarose a 30 g/L, sorbitol a 45,5 g/L, manitol a 45,5 g/L, mio-inositol a 100 mg/L, pH 6,0) por matraz de modo a plasmolisar as células. Colocaram-se os matrizes num agitador no escuro durante 30-35 minutos e durante este tempo preparou-se uma suspensão a 50 mg/ml de fios ("whiskers") de carbeto de silício por adição do volume adequado de meio líquido GN6 S/M a ~405 mg de fios ("whiskers") de carbeto de silício (Advanced Composite Materials, Inc.) pré-autoclavados.

Após incubação em GN6 S/M, recolheram-se conjuntamente os conteúdos de cada matraz para um frasco de centrífuga de 250 ml. Depois de todas as células terem sedimentado no fundo, retirou-se todo o GN6 S/M líquido excepto ~14 ml e recolheu-se para um frasco de 1 L estéril para futura utilização. Sujeitou-se a suspensão de fios ("whiskers") pré-molhada a vortex durante 60 segundos à velocidade máxima e adicionou-se 8,1 ml ao frasco, ao qual se tinha adicionado 170 µg de ADN como última etapa. Colocou-se o frasco imediatamente num misturador de tinta comercial Red Devil 5400 modificado e agitou-se durante 10 segundos. Após agitação, adicionou-se a mistura de células, meios, fios ("whiskers") e ADN ao conteúdo de um matraz de 1 L conjuntamente com 125 ml de meio líquido GN6 fresco para reduzir o agente osmótico. Deixaram-se as células recuperar num agitador durante 2 horas antes de se filtrar com papel de filtro Whatman n.º 4 (5,5 cm) utilizando uma unidade de recolha de célula de vidro ligada a uma linha de vácuo.

Pipetou-se 3 ou 6 mL de suspensão dispersa para a superfície do filtro e ligou-se o vácuo. Colocaram-se os filtros em placas de 60 x 20 mm de meio GN6. Cultivaram-se as placas durante 1 semana a 28°C numa caixa escura que foi fechada folgadoamente com uma única camada de plástico (< 2 mm de espessura) para minimizar a evaporação das placas individuais.

Após 1 semana, transferiram-se os papéis de filtro para placas de 60x20 mm de meio GN6 (1H) (meio N6, 2,4-D a 2,0 mg/L, sacarose a 30 g/L, mio-inositol a 100 mg/L, bialafos a 1,0 mg/L; Gelrite a 2,5 g/L, pH 5,8) ou meio GN6D (1H) (igual a GN6 (1H) excepto com dicamba a 8,0 mg/L e 2,4-D a 0,8 mg/L).

Colocaram-se as placas em caixas e cultivaram-se como anteriormente durante uma semana adicional. Duas semanas após transformação, embebeu-se o tecido raspando ½ das células na placa ou todas as células na placa para 3,0 mL de meio GN6 de

agarose fundido (meio N6, 2,4-D a 2,0 mg/L, sacarose a 30 g/L, mio-inositol a 100 mg/L, agarose Sea Plaque a 7 g/L, pH 5,8, autoclavado durante apenas 10 minutos a 121°C) contendo bialafos a 1 mg/L. Quebrou-se o tecido e despejou-se homogeneamente os 3 mL de agarose e tecido na superfície de uma placa de 100 x 15 mm de meio GN6 (1H) ou GN6D (1H). Repetiu-se isto para todas as placas restantes. Uma vez embebidas, selaram-se individualmente as placas com Nescofilm® ou Parafilm M® e seguidamente cultivaram-se durante 1 semana a 28°C em caixas escuras.

Os isolados supostamente transformados foram tipicamente visíveis 5-8 semanas após transformação. Removeram-se todos os isolados potenciais da placa embebida e transferiram-se para meio de selecção fresco da mesma concentração em placas de 60 x 20 mm. Nos casos em que foi evidente crescimento sustentável após aproximadamente 2 semanas, considerou-se o evento resistente e foi submetido para análise molecular.

Iniciou-se a regeneração por transferência de tecido de calo para um meio de indução baseado em citoquinina, 28 (1H), contendo bialafos a 1 mg/L, sais e vitaminas MS, sacarose a 30,0 g/L, BAP a 5 mg/L, 2,4-D a 0,25 mg/L, Gelrite a 2,5 g/L; pH 5,7. Deixaram-se crescer as células em luz baixa ($13 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante uma semana e seguidamente com luz mais forte ($40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante outra semana antes de se transferirem para meio de regeneração, 36 (1H), que foi idêntico a 28 (1H) excepto sem os reguladores de crescimento de plantas. Removeram-se plântulas pequenas (3-5 cm) e colocaram-se em tubos de cultura de 150 x 25 mm contendo meio SHGA sem selecção (sais e vitaminas basais de Schenk e Hildebrandt, 1972; mio-inositol a 1 g/L, sacarose a 10 g/L, Gelrite a 2,0 g/L, pH 5,8). Quando as plântulas desenvolveram um sistema de raiz e rebento suficiente, foram transplantadas para solo na estufa.

7.6 - Transformação mediada por fios ("WHISKERS") utilizando selecção com haloxifop.

Os parâmetros de entrega de ADN para selecção directa com "fop" foram idênticos ao procedimento de selecção com bialafos excepto que se co-transformaram conjuntamente 85 µg de pDAB3403 e 85 µg de construção contendo um gene repórter de GFP (proteína fluorescente verde) e apenas se filtraram 3 mL de suspensão para meio GN6 seguido de uma recuperação de 2 horas.

Após 0-7 dias em meio GN6 isento de selecção, transferiram-se os papéis de filtro para placas de 60x20 mm de meio GN6 contendo 2,4-D a 2 mg/L e ácido R-haloxifop 50, 100, ou 200 nM. Colocaram-se as placas em caixas e cultivaram-se durante uma semana adicional. Após uma semana, o tecido foi embebido raspando todas as células da placa para 3,0 mL de meio GN6 de agarose fundido contendo a mesma concentração de agente de selecção da transferência anterior. Todas as etapas seguintes foram idênticas ao protocolo de selecção/regeneração PAT excepto por se ter incluído ácido R-haloxifop 100 nM no meio de regeneração em vez de bialafos a 1 mg/L.

7.7 - Resultados.

Iniciaram-se múltiplas experiências de ensaio de vários níveis de haloxifop e ci-halofop e recuperaram-se 47 isolados da selecção directa. Submeteu-se um subconjunto dos eventos de calo a rastreio utilizando análise por PCR e "Western". Após estes dados de expressão, submeteram-se 21 eventos principais a análise "Southern". Os resultados utilizando NcoI, um cortador único, para obter dados de integração após sondagem com *AAD-1 (v3)*, demonstram inequivocamente integração estável de *AAD-1 (v3)* após transformação mediada por fios ("Whiskers") acoplada a selecção com "fop".

7.8 - Demonstração quantitativa de tolerância *in vitro* de eventos de calo que expressam *AAD-1 (v3)* de selecção com bialafos

Submeteram-se noventa e sete isolados de calo recuperados de selecção com bialafos a análise do número de cópias de PAT

através de Invader e análise de PTU de *AAD-1 (v3)* através de PCR (consultar exemplo 7.10). Efectuou-se expressão de proteína *AAD-1 (v3)* utilizando transferência "Western"/ELISA em sanduíche (exemplo 11) num subconjunto dos eventos. Descreve-se um resumo na seguinte **tabela 21**. Regeneraram-se pelo menos 15 plantas T_0 de cada um destes eventos e enviaram-se para ensaio de pulverização e produção de semente.

Evento	N.º de cópias de PAT	PCR para PTU de <i>AAD-1 (v3)</i>	"Western" de calo
3404-001	2	+	+
3404-006	2	+	+
3404-013	3	+	+
3404-017	1	+	+
3404-020	3	+	Nd
3404-022	2	+	+
3404-025	2	+	+
3404-027	3	+	+
3404-031	1	+	+
3404-033	2	+	Nd
3404-036	3	+	+
3404-044	3	+	+
3404-050	3	+	+
3404-053	3	+	+
3404-074	2	+	+
3404-082	2	+	+

Avaliou-se um subconjunto menor destes eventos em estudos de dose-resposta em comparação com controlo não transformado. Ensaiou-se uma gama de concentrações de haloxifop (de formulação Gallant Super), até 400 nM. Os dados de dose-resposta para um evento, 3404-006, foram gerados utilizando os métodos gerais do exemplo 7.4 e apresentam-se na **figura 13**. Tal demonstra que o evento 3404-006 não apresentava qualquer redução significativa de crescimento de calo a concentrações de haloxifop até 400 nM, enquanto o crescimento de tecido de calo de milho não transgénico foi inibido a esta taxa. Estes dados não foram normalizados para contabilizar as diferenças de crescimento inerentes que não estão relacionadas com a expressão do transgene.

7.9 Transformação mediada por fios ("WHISKERS") utilizando selecção com imazetapir.

Removeu-se a cassette ZmUbi1/AAD-1 (v3)/ZmPer5 de pDAB3404 com AscI/SwaI e inseriu-se em pDAB2212 para criar o vector de transformação com fios ("Whiskers") pDAB3415 com AAD-1 (v3) e AHAS, que também se denomina pDAS1283. Uma vez completa, transformou-se esta construção para milho através de transformação mediada por fios ("whiskers") de carbeto de silício tal como descrito no exemplo 7.4, excepto que se filtraram 2 mL de células seguida de uma recuperação de 7 dias em meio GN6, seguida de selecção em meio contendo herbicida imazetapir 3 µM de Pursuit® DG. Após análise Invader, identificaram-se 36 eventos que continham os genes AAD-1 (v3) e AHAS.

Ensaíram-se cinquenta e três calos de milho destas transformações em experiências de ELISA e de transferência "Western" para a sua expressão de AAD-1 (v3) - apresenta-se um subconjunto dos dados seguidamente. Para os eventos apresentados na **tabela 22**, os níveis de expressão desses positivos detectados variaram na gama de 90 até mais de 1000 ppm de proteínas solúveis totais.

Tabela 22.		
N.º de identificação de evento AAD-1	Nível de expressão (ppm)	Transferência "Western"
1283[1]-001	2	-
1283[1]-002	206	+++
1283[1]-003	1	-
1283[1]-004	90	+++
1283[1]-005	1	-
1283[1]-006	105	+++
1283[1]-007	212	++
1283[1]-008	114	±
1283[1]-009	305	+
1283[1]-010	2	-
1283[1]-011	4	-
1283[1]-012	200	+++
1283[1]-013	134	+++
1283[1]-014	4	-

Tabela 22.		
N.º de identificação de evento AAD-1	Nível de expressão (ppm)	Transferência "Western"
1283[1]-015	194	+++
1283[1]-016	4	-
1283[1]-017	196	+++
1283[1]-018	3	-
1283[1]-019	178	+
1283[1]-020	260	++
1283[1]-021	144	+++
1283[1]-022	140	+++
1283[1]-023	191	+++
1283[1]-024	392	++
1283[1]-025	368	++
1283[1]-026	14	-
1283[1]-027	1006	++
Controlo negativo	3	-
Controlo negativo	3	-
Padrão (0,5 µg/mL)		++
Padrão (5 µg/mL)		++++

7.10- Análise molecular: Materiais e métodos de milho.

7.10.1 - Colheita de tecido, isolamento e quantificação de ADN.

Colocou-se tecido fresco em tubos e liofilizou-se a 4°C durante 2 dias. Após o tecido estar completamente seco, colocou-se uma pérola de tungsténio (Valenite) no tubo e as amostras foram sujeitas a 1 minuto de moagem a seco utilizando um moinho de bolas Kelco. Seguiu-se então o procedimento de isolamento de ADN padrão DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Corou-se então uma alíquota do ADN extraído com Pico Green (Molecular Probes P7589) e leu-se no fluorómetro (BioTek) com padrões conhecidos para obter a concentração em ng/µl.

7.10.2 - Análise por ensaio Invader.

Diluíram-se as amostras de ADN a 20 ng/µl, seguidamente desnaturaram-se por incubação num termociclador a 95°C durante 10 minutos. Preparou-se então mistura de sonda de sinalização utilizando a mistura de oligonucleótidos e MgCl₂ (Third Wave

Technologies) proporcionada. Colocou-se uma alíquota de 7,5 µl em cada poço da placa de ensaio Invader, seguido por uma alíquota de 7,5 µl de controlos, padrões e amostras desconhecidas diluídas a 20 ng/µl. Cobriu-se cada poço com 15 µl de óleo mineral (Sigma). As placas foram então incubadas a 63°C durante 1 hora e leram-se no fluorómetro (Biotek). Para o cálculo da razão, calculou-se a % sinal acima da linha de base para a sonda alvo dividida pela % sinal acima da linha de base da sonda de controlo interno. Utilizou-se a razão de padrões de número de cópias conhecidos, revelados e validados por análise de transferência "Southern", para identificar as cópias estimadas dos eventos desconhecidos.

7.10.3 - Reacção de polimerização em cadeia.

Utilizou-se um total de 100 ng de ADN total como molde. Utilizou-se cada iniciador a 20 mM com o kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Os iniciadores para o AAD-1 (v3) PTU foram (Directo - ATAATGCCAGC CTGTAAACGCC) (SEQ ID NO:25) e (Inverso - CTCAAGCATATGAATGACCT CGA) (SEQ ID NO:26). Efectuou-se a reacção de PCR no termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), submetendo as amostras a 94°C durante 3 minutos e 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 63°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Os iniciadores para PCR de região de codificação de AAD-1 (v3) foram (Directo - ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:27) e (Inverso - CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:28). Efectuou-se a reacção de PCR no termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), submetendo as amostras a 94°C durante 3 minutos e 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Analisaram-se os produtos de PCR por electroforese num gel de agarose a 1% corado com EtBr.

7.10.4 - Análise de transferência "Southern".

Efectuou-se análise de transferência "Southern" com ADN total obtido do kit Qiagen DNeasy. Sujeitou-se um total de

2 µg de ADN a uma digestão durante a noite de Afl II e também EcoRV para pDAB3404, NcoI para pDAB3403 e SpeI para pDAB1421 para obter dados de integração. Após a digestão durante a noite, correu-se uma alíquota de ~100 ng num gel a 1% para assegurar digestão completa. Após se ter assegurado tal, correram-se as amostras num gel de agarose a 0,85% grande durante a noite a 40 volts. O gel foi então desnaturado em NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. O gel foi então neutralizado em Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M pH de 7,5 durante 30 minutos. Preparou-se um aparelho de gel contendo SSC 20x para transferir um gel por gravidade para membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante a noite. Após a transferência durante a noite, a membrana foi então sujeita a luz UV através de reticulador (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. A membrana foi então lavada em SDS a 0,1%, SSC 0,1x durante 45 minutos. Após a lavagem de 45 minutos, a membrana foi incubada durante 3 horas a 80°C e seguidamente armazenada a 4°C até hibridação. Preparou-se o fragmento de molde de hibridação utilizando a região de codificação de PCR anterior utilizando o plasmídeo pDAB3404. O produto foi então corrido num gel de agarose a 1% e excisado e seguidamente extraído do gel utilizando o procedimento de extracção de gel de Qiagen (28706). A membrana foi então sujeita a uma etapa de pré-hibridação a 60°C durante 1 hora em tampão Perfect Hyb (Sigma H7033). Utilizou-se o procedimento de reacção de marcação com dCTP Prime it RmT (Stratagene 300392) para revelar a sonda baseada em p32 (Perkin Elmer): Limpou-se a sonda utilizando colunas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Utilizaram-se dois milhões de contagens CPM para hibridar as transferências "southern" durante a noite. Após a hibridação durante a noite, sujeitaram-se então as transferências a duas lavagens de 20 minutos a 65°C em SDS a 0,1%, SSC 0,1x. Expuseram-se então as transferências a película durante a noite, incubando a - 80°C.

Exemplo 8 - Dados de tolerância *in vivo* e tolerância no campo gerados a partir de eventos AAD-1 (v3) seleccionados por PAT (pDAB3404)

8.1 - Tolerância de plantas de milho T₀ a herbicidas AOPP.

Caso se tenham regenerado com sucesso mais de 15 clones de plantas por evento, transferiram-se então plantas extra para a estufa para rastreio preliminar de tolerância com herbicidas AOPP aplicados pós-emergência em plantas de milho T₀. Deixou-se que as plantas aclimatadas a estufa crescessem até à emergência do verticilo de 2-4 folhas novas e de aparência normal (i.e., as plantas mudaram das condições de crescimento de cultura de tecidos para as condições de crescimento de estufa). Cresceram-se as plantas a 27°C em condições de 16 horas de luz: 8 horas de escuro na estufa. Trataram-se então as plantas com formulações comerciais de um de três herbicidas AOPP: Assure[®] II (DuPont), Clincher* (Dow AgroSciences) ou Gallant Super* (Dow AgroSciences) para quizalofop, ci-halofop ou haloxifop, respectivamente. As aplicações de herbicida foram efectuadas com um moto-pulverizador a um volume de pulverização de 187 L/ha, altura de pulverização de 50 cm e todos os líquidos para pulverização continham adjuvante concentrado de óleo de cultura Agridex a 1% v/v. O número de clones de cada evento variou de semana a semana devido à taxa de regeneração e aclimação de cada evento. Globalmente fez-se uma tentativa de tratar clones representativos de cada evento com uma gama de doses de herbicida entre 1X a dose letal (~1/8 X a dose de campo) até 8X a dose de campo (64 X a dose letal). Define-se uma dose letal como a taxa que provoca uma lesão >95% ao Hi-II de linha consanguínea. Hi-II são os antecedentes genéticos dos produtos de transformação do presente invento.

Os AOPP são geralmente herbicidas muito potentes na eliminação de milho. O milho com três a quatro folhas Hi-II cultivado a partir da semente é eliminado eficazmente (>95% de lesão) com 8,8, 62,5 e 4,4 g ae/ha de haloxifop, ci-halofop e quizalofop, respectivamente. Cada uma das linhas ensaiadas e transformadas com AAD-1 (v3) sobreviveu a uma dose minimamente letal de cada herbicida AOPP ensaiado. De facto, a maioria das linhas ensaiadas sobreviveu sem lesões visíveis (14 DAT) mesmo quando tratada com uma dose de campo de 8X (64X a dose letal)

de quizalofop. No entanto, vários clones individuais dos eventos "017" e "038" sofreram lesões significativas com taxas elevadas. Tal poderia ser uma consequência de expressão gênica reduzida devido à forma ou local de inserção do gene.

Demonstrou-se o elevado nível de tolerância a AOPP para a maioria dos eventos, mesmo quando se fizeram aplicações em plantas acabadas de sair da cultura de tecidos (estágio T₀). Significativamente, demonstrou-se esta tolerância para os três herbicidas AOPP e provavelmente poderá estender-se a todos os herbicidas AOPP tal como previamente demonstrado para AAD-1 *in vitro*.

A **figura 14** apresenta as respostas de vários clones de eventos transformados com AAD-1 (v3) ou não transformados a doses letais de dois herbicidas AOPP (haloxifop e quizalofop) aplicados uma semana antes.

A **tabela 23** apresenta dados para as respostas de eventos de milho T₀ transformados com AAD-1 (v3) seleccionados, a três herbicidas AOPP aplicados após emergência.

Tabela 23. Resposta de eventos de milho T₀ transformados com AAD-1 (v3) seleccionados a três herbicidas AOPP aplicados após emergência.

Construção	Evento	Clone	Haloxifop* g ae/ha	Ci-halofop** g ae/ha	Quizalofop*** g ae/ha	% lesão 14 DAT
3404	001	016	8,8			0
3404	001	018		62,5		0
3404	001	017			8,8	0
3404	001	019			8,8	30
3404	001	020			35	0
3404	017	018			35	0
3404	017	019			35	0
3404	017	020			70	0
3404	017	021			70	0
3404	017	022			140	0
3404	017	023			140	30
3404	017	024			280	30
3404	017	025			280	20
3404	022	019	8,8			0
3404	022	020	17,5			0
3404	022	016	17,5			0
3404	022	024		62,5		0
3404	022	018		125		0

Tabela 23. Resposta de eventos de milho T₀ transformados com AAD-1 (v3) seleccionados a três herbicidas AOPP aplicados após emergência.

Construção	Evento	Clone	Haloxifop* g ae/ha	Ci-halofop** g ae/ha	Quizalofop*** g ae/ha	% lesão 14 DAT
3404	022	021			8,8	0
3404	022	017			17,5	0
3404	022	022			35	0
3404	022	023			70	0
3404	033	012			35	0
3404	033	013			70	0
3404	033	014			70	0
3404	033	015			140	0
3404	033	016			280	0
3404	038	016	8,8			0
3404	038	018		62,5		0
3404	038	017			8,8	0
3404	038	019			35	70
3404	038	020			35	80
3404	038	021			70	80
3404	038	022			70	80

(dose letal = 8,8 g ae/ha) (dose letal = 62,5 g ae/ha) (dose letal = 4,4 g ae/ha)

*Gallant super[‡] + COC a 1% (v/v)

**Clincher[‡] + COC a 1% (v/v)

***Assure II + COC a 1% (v/v)

[‡]Marca registada de Dow AgroSciences, LLC

8.2 - Tolerância no campo de plantas de milho pDAB3404 T₁ aos herbicidas quizalofop, 2,4-D e glufosinato.

Estabeleceram-se dois ensaios de campo nas estações de campo no Havai e Indiana. Utilizou-se sementes de milho de plantas T₁ consanguíneas para avaliar dezasseis linhas de evento AAD1 para tolerância a quizalofop e 2,4-D. Incluíram-se três híbridos não transformados com objectivos comparativos. O híbrido Hi-II x 5XH571 é da mesma linhagem das linhas de evento AAD-1 (v3). O híbrido Croplan 585SR é uma linha resistente a setoxidim.

A concepção experimental foi um talhão dividido com quatro réplicas. O talhão principal foi tratado com herbicida e o sub-talhão foi evento AAD-1(v3) ou híbrido de comparação. Os talhões tinham uma fila por cada 3,7 metros com aproximadamente vinte e cinco sementes plantada em cada fila.

Para eventos AAD1 plantaram-se em cada replicado sementes de uma linhagem diferente dentro de cada evento.

Aplicou-se glufosinato a 560 g ae/ha nos talhões AAD-1 (v3) no estágio V2 para eliminar plantas não transformadas. Os tratamentos experimentais incluíram formulações comerciais de quizalofop aplicadas a 70 e 140 g ae/ha, 2,4-D (sal de dimetilamina) a 560 e 1120 g ae/ha e um controle não tratado. Aplicaram-se os tratamentos utilizando equipamento pulverizador de mochila com vara com entrega de 187 L/ha de volume de transportador a uma pressão de 130-200 kpa. Aplicaram-se os tratamentos com quizalofop no estágio V3-V4 do milho e aplicaram-se os tratamentos com 2,4-D no estágio V5-V6.

Os talhões tratados com quizalofop foram avaliados visualmente para lesões nas colheitas às uma e três semanas após aplicação (WAA) usando uma escala 0-100%, em que 0 corresponde a ausência de lesão e 100 corresponde a morte completa. Os talhões tratados com 2,4-D foram avaliados visualmente para inclinação da planta aos 2 dias após aplicação (DAA) usando uma escala 0-100%, em que 0 corresponde a ausência de inclinação em todas as plantas e 100 corresponde a todas as plantas estarem inclinadas. Adicionalmente, os talhões 2,4-D foram avaliados visualmente a 3-4 WAA para deformação de raiz adventícia usando uma escala 0-10.

8.2.1- Resultados.

Apresenta-se na **tabela 24** a resposta do evento AAD-1 (v3) às taxas mais elevadas ensaiadas de quizalofop e 2,4-D. Estas taxas representam aproximadamente duas vezes as taxas utilizadas normalmente comercialmente. Os híbridos não transformados foram gravemente lesionados (80-100%) por quizalofop a 70 g ae/ha incluindo a linha resistente a setoxidim, apesar de apresentar tolerância ligeiramente melhorada do que os outros dois híbridos. Todos os eventos AAD-1 (v3) com exceção de uma linhagem do evento 3404.001 apresentaram tolerância excelente a quizalofop a 70 g ae/ha.

Não se observaram sintomas visíveis nos eventos AAD-1 (v3) com exceção dos eventos anteriormente mencionados.

Tratamento (taxa)=	Quizalofop (140 g ae/ha)		Amina de 2,4-D (1120 g a e/ha)		Amina de 2,4-D (1120 g ae /ha)		Resultados da análise			Razões de resistência à segregação após pulverização com Liberty		
	IN	HI	IN	HI	IN	HI	números de cópias AAD-1 em folhas (análise "Southern" em folha T ₀)	transfe rência de "Western" AAD-1 em folha T ₀	ELISA de AAD-1 em folha T ₀	Média da população T ₁	Média da população T ₂	
3404.001	25	25	0	5	1	2	3	+++	+++	40%	47%	X
3404.006	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	33%	26%	X
3404.013	0	0	0	0	0	0	1	+	+++	63%	58%	X
3404.017	0	0	1	0	0	0	2	+/-	++	48%	47%	X
3404.020	0	0	0	0	0	0	2	++	+++	50%	51%	X
3404.022	0	0	1	0	0	0	1	+	++	51%	57%	76%*
3404.025	0	0	0	0	0	0	2	+++	++++	55%	59%	X
3404.027	0	0	3	0	0	0	5	+	++	51%	50%	X
3404.031	0	0	1	0	0	0	1	++	++++	47%	43%	61%*
3404.033	0	0	0	0	0	0	2 ou 3	+	++	52%	49%	X
3404.036	0	0	0	0	0	0	4	++	+++	52%	48%	X
3404.044	0	0	1	0	0	1	1	+	+/-	50%	48%	X
3404.050	0	0	0	1	0	1	2	nd	nd	38%	28%	X
3404.053	0	0	1	0	0	0	2	+++	+++	48%	56%	X
3404.074	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	53%	52%	73%*
3404.082	0	0	0	0	0	1	3	nd	nd	38%	36%	X
DK493	100	100	20	23	8	9						
HI-II X												
5XH571	100	100	13	34	7	9						
CROPLAN												
585SR	80	96	11	33	9	9						

* Ajusta a segregação de característica dominante de local único tal como determinada pelo teste do Qui quadrado (P>0,05)

2,4-D a uma taxa de 1120 g ae/ha provocou níveis significativos (11-33%) de inclinação com torção do pecíolo nos híbridos não transformados, uma resposta normal quando aplicado após o estágio de crescimento V4. Observou-se pouca ou nenhuma inclinação em todos os eventos AAD-1 (v3) com exceção de uma linhagem de 3404.001_{2 ou 3} (local do Indiana apenas) na qual se observaram níveis moderados de inclinação (5-13%).

As raízes adventícias de híbridos não transformados estavam gravemente deformadas (classificação de 9 numa escala de 0-10) por 2,4-D à taxa de 1120 g ae/ha. Mais uma vez esta é uma resposta normal a 2,4-D aplicado para além da fase de crescimento V4. Tal como com a resposta à inclinação, observaram-se poucas ou nenhuma lesões das raízes adventícias com todos os eventos AAD-1 (v3) com excepção de uma linhagem de 3404.001.

Ocorreram tendências semelhantes para razões ensaiadas inferiores de quizalofop e 2,4-D apesar de terem sido em níveis de resposta reduzidos mas ainda significativos nos híbridos não transformados (dados não apresentados).

Estes resultados indicam que a maioria das linhas de eventos transformadas com AAD-1 (v3) apresentaram um elevado nível de resistência a quizalofop e 2,4-D com taxas que foram letais ou provocaram malformações com torção do pecíolo grave em híbridos de milho não transformados. Consultar também a **figura 16**.

8.2.2 - Razões esperadas de segregação mendeliana em três eventos T₂.

Autopolinizaram-se aleatoriamente no campo plantas de linhagens individuais de cada evento. Recolheram-se manualmente sementes T₂ na maturidade fisiológica. Com base no número de cópias de gene único (consultar **tabela 24** anteriormente) e desempenho global na geração T₁ (segregação, tolerância a herbicida e vigor) escolheram-se três eventos (022, 031 e 074) para avaliação adicional no campo. Plantaram-se as filas de cultura de cada evento utilizando um semeador de cone de precisão consistindo cada um de 2500-3000 sementes. No estágio de crescimento V2 pulverizaram-se todas as linhas AAD-1 (v3) com quizalofop (Assure® II) 140 g ae/ha utilizando um pulverizador de mochila tal como anteriormente descrito. Esta taxa eliminou rapidamente todos os produtos de segregação "nulos" (não transformados). Cada

evento apresentou uma razão de segregação consistente com gene dominante com hereditariedade mendeliana de um único local (3 resistentes:1 sensível ou 75% de sobrevivência) (consultar **tabela 24**). Identificaram-se homozigotos e hemizigotos do evento 74 por ensaio de zigotia (referência à descrição do ensaio AAD-1 (v3) Invader para milho). Removeram-se as plantas hemizigóticas e cruzaram-se plantas homozigóticas AAD-1 (v3) com milho BE1146 consanguíneo com introgressão e homozigótico para a característica de resistência a glifosato, NK603, gerando uma semente híbrida F₁ homogênea que é hemizigótica para resistência a glifosato, AAD-1 (v3) e resistência a glufosinato.

8.3 - Junção de AAD-1 (v3) e PAT com genes de resistência a glifosato em milho.

Cruzaram-se plantas de milho homozigóticas T₂ AAD-1 (v3)/PAT com plantas de milho resistentes a glifosato produzindo-se uma semente F₁ contendo AAD-1 (v3), PAT e genes de resistência a glifosato tal como descrito no exemplo anterior.

Plantaram-se individualmente sementes F₁ em vasos de 3 polegadas preparados com meio de crescimento Metro-Mix® 360 (Sun Gro Horticulture). Os vasos foram inicialmente sub-irrigados com solução Hoagland até ficarem molhados e seguidamente permitiu-se drenagem por gravidade e crescimento a 27°C em condições de 16 horas de luz:8 horas de escuro na estufa. Até ao final do estudo sub-irrigaram-se as plantas com água desionizada.

Deixou-se crescer as plantas até ao aparecimento de 2-4 folhas do verticilo. Nesta altura fizeram-se aplicações de herbicida com um moto-pulverizador a um volume de pulverização de 187 L/ha, altura de pulverização de 50 cm. Pulverizaram-se as plantas com taxas de 2,4-D DMA, glifosato, glufosinato e várias combinações dos três. Formularam-se todas as aplicações em tampão Hepes 200 mM (pH 7,5). Em aplicações de pulverização

nas quais estava presente glufosinato formulou-se o tratamento com a adição de sulfato de amónio a 2% p/v.

Avaliaram-se as plantas 3 e 14 dias após o tratamento (DAT). Atribuíram-se às plantas pontuações de lesão relativamente a nanismo, clorose e necrose. As plantas com uma pontuação de lesão de 90% ou superior consideram-se mortas. Os resultados do estudo a 14 DAT podem observar-se na **tabela 25**.

Tabela 25.			
	Taxa de campo	% de lesão a 14 DAT	
		Hi II X 5XH751	RR/PAT/AAD1
		Média	Média
Controlo não tratado	-	0	0
Glifosato a 840 g ae/ha	1X	98	0
Glifosato a 1680 g ae/ha	2X	100	0
Glifosato a 3360 g ae/ha	4X	100	0
2,4-D DMA a 560 g ae/ha	1X	10	0
2,4-D DMA a 1120 g ae/ha	2X	14	0
2,4-D DMA a 2240 g ae/ha	4X	29	0
Glufosinato a 470 g ae/ha	1X	80	0
Glufosinato a 940 g ae/ha	2X	90	3
Glufosinato a 1880 g ae/ha	4X	96	15
Glifosato a 840 g ae/ha + 2,4-D DMA a 560 g ae/ha	1X + 1X	96	1
Glifosato a 1680 g ae/ha glifosato + 2,4-D DMA a 1120 g ae/ha	2X + 2X	100	2
Glifosato a 3360 g ae/ha glifosato + 2,4-D DMA a 2240 g ae/ha	4X + 4X	100	1
Glufosinato a 470 g ae/ha + 2,4-D DMA a 560 g ae/ha	1X + 1X	89	5
Glufosinato a 940 g ae/ha + 2,4-D DMA a 1120 g ae/ha	2X + 2X	91	10
Glufosinato a 1880 g ae/ha + 2,4-D DMA a 2240 g ae/ha	4X+4X	97	13
Glifosato a 840 g ae/ha + glufosinato a 470 g ae/ha	1X + 1X	90	5
Glifosato a 1680 g ae/ha + glufosinato a 940 g ae/há	2X+2X	98	15
Glifosato a 3360 g ae/ha + glufosinato a 1880 g ae/há	4X + 4X	100	15

Este estudo demonstrou que o gene *AAD-1 (v3)* em milho pode ser junto com um gene de resistência a glifosato e com um gene de resistência a glufosinato para proporcionar uma tolerância robusta ao nível do campo contra 2,4-D, glifosato e glufosinato sozinhos ou em combinações misturadas em tanque.

8.3.1 - Resistência de milho *AAD-1 (v3)* utilizando uma mistura em tanque de 2,4-D DMA e quizalofop.

Plantaram-se sementes T₂BC₁ do evento hemizigótico número 3404-025.001R/R001 Bulked.001.5058 individualmente em vasos de 3 polegadas preparados com meio de crescimento Metro-Mix® 360. Inicialmente sub-irrigaram-se os vasos com solução Hoagland até ficarem molhados e seguidamente permitiu-se drenagem por gravidade e crescimento a 27°C em condições de 16 horas de luz:8 horas de escuro na estufa. Até ao final do estudo sub-irrigaram-se as plantas com água desionizada.

Deixou-se crescer as plantas até ao estágio V1 na estufa. Nesta altura seleccionaram-se as plantas com Assure® II a 560 g ae/ha com a adição de óleo de cultura Agridex a 1% v/v em tampão Hepes 200 mM com o moto-pulverizador de investigação a 187 L/ha. Deixaram-se as plantas durante 4 dias para mostrarem sintomas da selecção. Nenhuma das plantas apresentou lesões. As aplicações de herbicida foram efectuadas com um moto-pulverizador a um volume de pulverização de 187 L/ha, altura de pulverização de 18 polegadas. Formularam-se todas as aplicações em tampão Hepes 200 mM (pH 7,5) com a adição de Agridex a 1% v/v.

Aos 3 e 14 dias após tratamento (DAT) avaliaram-se as plantas. Atribuíram-se pontuações de lesão às plantas relativamente a nanismo, clorose e necrose. As plantas com uma pontuação de lesão de 90% ou superior consideram-se mortas. As plantas desta linhagem específica apresentavam 0% de lesões a 14 DAT para todas as combinações de misturas em tanque, enquanto o tipo selvagem apresentava 100% de lesão. Estes resultados indicam que *AAD-1 (v3)* proporciona não apenas uma resistência robusta ao nível do campo contra 2,4-D e

quizalofop individualmente, mas também contra taxas exageradas de várias combinações desses dois produtos químicos. Esperar-se-ia logicamente implementar novas medidas de controlo de ervas daninhas com combinações de fenoxiauxinas e graminicidas AOPP em milho (ou outras culturas transformadas com AAD-1) que não eram anteriormente permitidas por HTC de um único gene.

8.3.2 - Tolerância de plantas de milho (pDAB3403) T₀ a herbicida quizalofop.

Regenerou-se um alvo de aproximadamente oito clones de planta T₀ de cada um de 17 eventos e transferiu-se para a estufa para rastreio preliminar de tolerância com taxa de discriminação aplicada pós-emergência de herbicida quizalofop aplicado com moto-pulverizador a 35 g ae/ha (1X taxa de campo, 4X dose letal) a plantas de milho T₀ com 3 folhas e adaptadas a estufa utilizando as condições de moto-pulverizador anteriormente descritas. Classificaram-se as plantas como resistentes ou sensíveis 7 dias após tratamento. Incluiu-se milho de controlo não transgénico em cada aplicação de pulverização. Dois eventos, evento 014 e 047, tinham dois ou mais clones T₀ sensíveis a quizalofop a 35 g ae/ha, indicando um nível inesperado de sensibilidade para este evento. Os outros 15 eventos apresentaram integração estável, expressão de proteína e capacidade de tolerar 4X a dose letal de quizalofop ao nível da planta total.

8.3.3 Expressão de AAD-1 (v3) relativamente a tolerância a quizalofop.

Escolheram-se três linhagens T2 diferentes de 3404 transformações que foram pré-rastreadas com Liberty® (tal como anteriormente descrito) para remover nulos, para comparar a sua tolerância a quizalofop relativamente à sua expressão de AAD-1 (v3). Mediu-se a expressão a 14 DAT (dados não apresentados) e a 30 DAT (ver **figura 15**). A linha com maior tolerância, evento 3404-074, expressou sempre uma quantidade mais elevada de AAD-1 (v3) do que os outros dois eventos com

taxas de campo de 1X e superior. Estes dados permitem concluir que o milho que expressa AAD-1 (v3) pode ser protegido de lesão por quizalofop ao nível mais elevado testado (2240 g/ha), que é 16 vezes a dose de campo 1X de 35 g/ha. Além disso, o nível de expressão foi consistente ao longo do período da experiência.

Exemplo 9 - Transformação mediada por *Agrobacterium* de milho com AAD-1 (v3)

9.1 - Material para plantas.

Plantam-se directamente sementes de um cruzamento F₁ "High II" (i.e., parente A e B) (Armstrong *et al.*, 1991) em vasos de 5 galões contendo Metro-Mix® 360:solo mineral 95:5. Cultivam-se as plantas na estufa com um fotoperíodo de 16 horas suplementado por uma combinação de candeeiros de sódio a pressão elevada e de halogeneto metálico.

9.2 - Fonte de tecido.

Para obter embriões imaturos Hi-II (F2) efectuaram-se subpolinizações controladas. No dia da polinização, colocaram-se em sacos as bandeiras com libertação activa e recolheu-se o pólen fresco e aplicou-se cuidadosamente nas barbas. Isolaram-se os embriões imaturos tal como descrito no exemplo 7.2.

9.3 - Preparação de um vector superbinário.

Construiu-se uma construção de *Agrobacterium*, pDAB2272, contendo o gene AAD-1 (v3) em combinação com o gene de marcação seleccionável AHAS por isolamento do fragmento NotI de 3443 pares de bases de pDAB3404 contendo ZmUbil v2/AAD-1 (v3)/ZmPer5 v2 e sua inserção no local NotI de pDAB8549. O plasmídeo resultante contém as cassetes ZmUbil v2/AAD-1 (v3)/ ZmPer5 v2 e OsAct1 v2/AHAS v3/ZmLip v1 flanqueadas por regiões MAR não idênticas na orientação directa. Este produto foi subsequentemente transformado em LBA4404/pSB1 para

criar o vector superbinário que se denominou pDAB3602 mas também se refere como pDAS1421.

9.4 - Fornecimento de bactérias.

Todas as transformações usam o vector "Super Binário" de Japan Tobacco descritas na patente U.S. 5 591 616 ("Método para transformar monocotiledóneas"). Para preparar a suspensão de *Agrobacterium* para tratamento, colocaram-se 1-2 ansas de bactérias recombinantes pDAS1421 de uma placa de cultura YP em 5 ml de meio LS-inf.Mod (meio basal LS (Linsmaier e Skoog, 1965), vitaminas N6, 2,4-D a 1,5 mg/L, sacarose a 68,5 g/L, glucose a 36,0 g/L, L-prolina a 6 mM, pH 5,2). Submeteu-se a mistura a vortex até se obter uma suspensão uniforme. Determinou-se a concentração bacteriana utilizando um colorímetro Klett-Summerson Photoelectric por leitura da densidade da solução. Ajustou-se a solução para uma concentração de Klett 200 ($\sim 1 \times 10^9$ ufc/ml) e adicionou-se acetossiringona 100 μ M à solução.

9.5 - Infecção e co-cultivo.

Isolaram-se os embriões imaturos directamente para um tubo de centrífuga contendo 2 ml de meio líquido LS-inf.Mod. Submeteu-se cada tubo, contendo ~ 100 embriões, a vortex durante 3-5 s. Removeu-se o meio e substituiu-se por meio líquido fresco e repetiu-se o vortex. Removeu-se novamente o meio líquido e desta vez substituiu-se com uma solução de *Agrobacterium* a uma concentração de Klett 200. Submeteu-se a mistura *Agrobacterium* e embrião a vortex durante 30 s. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, transferiram-se os embriões para meio LS-As Mod (meio basal LS, vitaminas N6, 2,4-D a 1,5 mg/L, sacarose a 30,0 g/L, L-prolina a 6 mM, AgNO₃ a 0,85 mg/L, acetossiringona 100 μ M, Gelrite a 3,0 g/L, pH 5,8) para uma co-cultura de 5 dias a 25°C.

9.6 - Dose-resposta utilizando embriões imaturos.

Iniciaram-se estudos dose-resposta utilizando embriões imaturos tratados com *Agrobacterium* estirpe LBA4404 isentos de

um plasmídeo tal como anteriormente descrito: após tratamento, co-cultivaram-se os embriões durante 5 dias a 25°C e transferiram-se então para meio de selecção contendo diferentes níveis de R-haloxifop ou R-ci-halofop. Transferiram-se também embriões para meio contendo bialafos a 1 mg/L e imazetapir 100 nM como controlos negativos. Pontuaram-se os embriões para % de formação de calo embriogénico após 2 semanas e novamente após 4 semanas. Ensaíram-se embriões para níveis de R-haloxifop até 30 nM; contudo, observou-se redução insuficiente de formação de calo nos níveis mais elevados pelo que se utilizaram concentrações mais elevadas (50 - 100 nM) durante as experiências de transformação. Apresentam-se na **figura 17** dados de embriões cultivados em meio contendo ci-halofop.

9.7 - Selecção.

Após co-cultivo, submeteram-se os embriões a um esquema de selecção em 2 etapas após o que se obtiveram isolados transformados. Para a selecção utilizou-se meio LSD Mod (meio basal LS, vitaminas N6, 2,4-D a 1,5 mg/L, MES a 0,5 g/L, sacarose a 30,0 g/L, L-prolina a 6 mM, AgNO₃ a 1,0 mg/L, cefotaxima a 250 mg/L, Gelrite a 2,5 g/L, pH 5,7) conjuntamente com um ou dois níveis de selecção de haloxifop, ci-halofop ou imazetafir. Ao longo da fase de selecção cultivaram-se os embriões no escuro a 28°C. Primeiro transferiram-se os embriões para um nível inicial de selecção (R-haloxifop 50-100 nM ou R-ci-halofop 300 nM) durante 14 dias e seguidamente mudaram-se para um nível de selecção superior (ácido R-haloxifop 250-500 nM ou ci-halofop 1,5 µM) a uma taxa de 5 embriões/placa. Submeteu-se igualmente um subconjunto de embriões a imazetafir de Pursuit® DG em aumento de 100 a 500 nM como um controlo positivo. Utiliza-se Pursuit® como agente de selecção química quando se utiliza o gene *AHAS*, com base na patente U.S. 5 731 180. Transferiu-se tecido a intervalos bissemanais no mesmo meio até à obtenção de colónias embriogénicas. Mantiveram-se estas colónias em pressão de selecção elevada durante o restante tempo de cultura. Juntaram-se as colónias transgénicas recuperadas por

transferência para meio de selecção fresco a intervalos de 2 semanas para regeneração e análise adicional.

9.8. - Regeneração e produção de sementes.

Para regeneração transferem-se as culturas para 28 meios de "indução" e 36 meios de "regeneração" tal como descrito anteriormente contendo R-haloxifop 100 nM ou ci-halofop 1,5 µM para diferenciação de plântulas. Quando as plântulas se estabeleceram, transferiram-se para tubos SHGA para permitir crescimento e desenvolvimento adicional do rebento e raízes tal como descrito anteriormente. Efectuaram-se polinizações controladas para produção de sementes tal como descrito anteriormente.

9.9 - Recuperação de eventos e detalhes da análise; rastreios de planta completa de linhagens de milho T₀ contendo AAD-1 (v3) e AHAS (pDAS 1421).

Seleccionaram-se setenta e dois eventos transformados com *Agrobacterium* em diferentes níveis de ácido de R-haloxifop e ácido de R-ci-halofop *in vitro*. Analisaram-se vinte e duas amostras de calos por análise de transferência "Southern" para integração estável de AAD-1 (v3) no genoma tal como descrito anteriormente. Escolheram-se dez eventos de cópia única, tal como indicado na **tabela 26**, para regeneração.

Tabela 26.					
Evento de milho	Agente de selecção <i>in vitro</i>	N.º de cópia "Southern" (calo)	Transferência "Western" (AAD-1) para calo T ₀	Avaliação de linhagens T ₀ resistentes a quizalofop 35 g ae/ha	
				Resistente	Sensível
	(nM)	AAD-1			
1421 [21]-016	50 Haloxifop	1	+	8	0
1421 [22]-020	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[22]-022	100 Haloxifop	1	+	8	0
1421[22]-023	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[3]-036	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[4]-031	300 Ci-halofop	1	++	9	0
1421[4]-032	300 Ci-halofop	1	++	8	0
1421[4]-033	300 Ci-halofop	1	++	12	0

Tabela 26.					
Evento de milho	Agente de selecção <i>in vitro</i>	N.º de cópia "Southern" (calo)	Transferência "Western" (AAD-1) para calo T ₀	Avaliação de linhagens T ₀ resistentes a quizalofop 35 g ae/ha	
				Resistente	Sensível
	(nM)	AAD-1			
1421[4]-034	300 Ci-halofop	1	++	8	0
1421[4]-035	300 Ci-halofop	1	++	6	0

Os eventos com mais que 1 cópia não se levaram para a estufa

Mudaram-se para solo na estufa um mínimo de seis linhagens clonais regeneradas por evento e rastrearam-se utilizando um moto-pulverizador tal como descrito anteriormente para aplicar quizalofop a 35 g ae/ha quando emergem 2-4 folhas novas e normais (consultar secção 8.3.3). A presença de proteína AAD-1 numa transferência "Western" correlacionou perfeitamente com resistência a herbicida na geração T₀ independentemente de qual o herbicida AOPP que se usasse para selecção. Não há impacto negativo do segundo gene HTC (*AHAS*) na função de *AAD-1* (v3).

Exemplo 10 - Purificação de AAD-1 (v1) para criação de anticorpo e caracterização bioquímica

Todas as operações durante a purificação foram efectuadas a 4°C. Ressuspenderam-se células de *E. coli* congeladas ou frescas de aproximadamente 1 L de cultura, cultivadas e induzidas tal como no exemplo 3, em 200 ml de tampão de extracção contendo Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM e 2 ml de mistura de inibição de proteases (Sigma) e partiram-se por tratamento no ultra-sons em gelo utilizando um aparelho de ultra-sons Branson. Obteve-se o extracto solúvel por centrifugação num rotor GSA (Sorvall) a 12 000 rpm (24 000g) durante 20 minutos. Carregou-se então o sobrenadante numa coluna de permuta iónica Mono Q (Pharmacia HR 10/10) equilibrada com Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 e lavou-se a coluna com o mesmo tampão durante 10 CV (80 ml). Eluíu-se a proteína com 80 ml de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,25 M em tampão de coluna, recolhendo-se fracções de 2 ml. Recolheram-se conjuntamente as fracções contendo AAD-1 (v1) e concentraram-se utilizando

colunas de centrifugação com membrana de MWCO 30 kDa (Millipore). A amostra foi então separada adicionalmente numa coluna de exclusão de tamanho Superdex 200 (Pharmacia, XK 16/60) com tampão contendo Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M e DTT 1 mM, pH 8,0 a uma caudal de 1 ml/min. Analisaram-se os resultados da purificação por SDS-PAGE e determinou-se a concentração de proteína pelo ensaio de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Exemplo 11 - Purificação de AAD 1 recombinante e produção de anticorpo

Manteve-se congelado a -80°C o plasmídeo pDAB3203 contendo o gene *AAD-1 (v1)* em células TOP10F' (Invitrogen) como estirpe recombinante Dow DR1878. Para expressão, transformou-se o ADN plasmídico purificado de cultura de células TOP10F' utilizando o kit Wizard da Promega (n.º de cat. Fisher PR-A1460) para células BL-21 Star (DE3) (n.º de cat. Invitrogen C6010-03) seguindo o protocolo do fabricante. Após transformação, plaquearam-se 50 μL das células em placas de ágar-ágar LB S/S e incubaram-se durante a noite a 37°C . Rasparam-se todas as colónias de toda a placa de ágar-ágar para 100 mL de LB num matraz de três aletas de 500 mL e incubou-se a 37°C com agitação a 200 rpm durante 1 h. Induziu-se então expressão génica com IPTG 1 mM e incubou-se durante 4 h a 30°C com agitação a 200 rpm. Centrifugaram-se todos os 100 mL de cultura a 4000 rpm durante 20 min. Deitou-se fora o sobrenadante e ressuspenderam-se os sedimentos em 200 mL de extracção contendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM e 2 mL de mistura de inibidor de protease (Sigma) e partiu-se por tratamento com ultra-sons em gelo utilizando um aparelho de ultra-sons Branson. Centrifugou-se o lisado a 24 000x g durante 20 min para remover os resíduos celulares. Submeteu-se então o sobrenadante contendo a proteína AAD-1 ao protocolo de purificação.

Todas as purificações de AAD-1 (v1) foram efectuadas a 4°C tal como discutido no exemplo 10, salvo indicação em contrário. Carregou-se o lisado celular numa coluna de permuta

iônica Mono Q (n.º de cat. Pharmacia HR 10/10) equilibrada com Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, seguido de lavagem com 80 mL do mesmo tampão. Eluíram-se as proteínas com 80 ml de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,25 M em tampão de coluna, recolhendo-se fracções de 2 ml. Recolheram-se conjuntamente as fracções contendo AAD-1 e concentraram-se utilizando colunas de centrifugação com membrana de MWCO 30 kDa (Millipore). A amostra foi então separada adicionalmente numa coluna de exclusão de tamanho Superdex 200 (Pharmacia, XK 16/60) com tampão contendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 0,15 M e DTT 1 mM. Determinou-se a concentração de proteína pelo ensaio de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Forneceram-se cinco miligramas de AAD-1 (v1) purificada a Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) para produção de anticorpo policlonal de coelho. O coelho recebeu 5 injeções no período de 5 semanas contendo cada injeção 0,5 mg da proteína purificada suspensa em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund. Ensaíram-se os soros por experiências de ELISA e de transferência "Western" para confirmar especificidade e afinidade antes de purificação por afinidade e conjugação com peroxidase de rábano (HRP) (Zymed Lab Inc).

11.1 - Extracção de AAD-1 (v3) de folhas de planta.

Cortaram-se aproximadamente 50 a 100 mg de tecidos de folhas em pequenas porções e puseram-se em tubos de microcentrífuga contendo 2 pérolas de aço inoxidável (4,5 mm; Daisy Co., n.º de cat. 145462-000) e 300 µL de tampão de extracção de planta (PBS contendo Triton X-100 a 0,1% e DTT 10 mM). Agitaram-se os tubos durante 4 min com um batedor de pérolas a velocidade máxima seguido de centrifugação durante 10 min a 5 000x g. Analisou-se o sobrenadante contendo as proteínas solúveis da planta para as concentrações totais de proteína solúvel (TSP) e de AAD-1 (v3).

11.2 - Ensaio de Bradford.

Determinou-se a concentração total de proteína solúvel de tecidos de folha de planta pelo ensaio de Bradford utilizando

albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Transferiram-se cinco microlitros de diluições em série de BSA em PBS ou extractos de planta para uma placa de microtitulação de 96 poços em triplicados. Para os padrões as concentrações foram na gama de 2000 a 15,6 µg/mL. O produto concentrado para ensaio de proteína foi primeiro diluído 5 vezes em PBS e adicionou-se 250 µL a cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min. Mediu-se cada densidade óptica (DO) a 595 nm utilizando um leitor de microplacas. Extrapolou-se a concentração de proteína para cada amostra a partir de uma recta padrão utilizando Softmax® Pro (ver. 4.0) (Molecular Devices).

11.3 - Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Realizou-se o ensaio à temperatura ambiente salvo indicação em contrário. Revestiram-se cem microlitros de anticorpo anti-AAD-1 purificado (0,5 µg/mL) numa placa de microtitulação de 96 poços e incubou-se a 4°C durante 16 horas. Lavou-se a placa quatro vezes com tampão de lavagem (soro fisiológico em tampão fosfato (PBS; pH 7,4) 100 mM contendo Tween 20 a 0,05%) utilizando um lavador de placas, seguido de bloqueamento com leite magro a 4% dissolvido em PBS durante 1 hora. Após lavagem, incubaram-se nos poços 100 µL de padrão AAD-1 de concentrações conhecidas ou extracto de planta (consultar secção anterior). Para a recta padrão, as concentrações de AAD-1 purificado variaram entre 100 e 1,6 ng/mL em triplicados. Diluíram-se os extractos de plantas 5, 10, 20 e 40 vezes em PBS e analisaram-se em duplicados. Após 1 hora de incubação, lavou-se a placa como anteriormente. Incubaram-se cem microlitros de anticorpo anti-AAD-1 conjugado com HRP (0,25 µg/mL) em cada poço durante 1 hora antes da lavagem. Incubaram-se cem microlitros de substrato de HRP, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Pierce), em cada poço durante 10 minutos antes da reacção ser parada por adição de 100 µL de H₂SO₄ 0,4N. Mediu-se a DO de cada poço utilizando um leitor de microplacas a 450 nm. Para determinar as concentrações de AAD-1 em extractos de planta, fez-se a média dos valores de DO

dos duplicados e extrapolou-se a partir da recta padrão utilizando Softmax® Pro ver. 4.0 (Molecular Devices).

Para comparação, normalizou-se cada amostra com a sua concentração TSP e calculou-se a percentagem de expressão de TSP.

11.4 - Análise de hibridação "Western".

Incubaram-se extractos de planta ou padrões AAD-1 (5 e 0,5 µg/mL) com tampão de amostra Laemmli a 95°C durante 10 minutos e separaram-se por electroforese num gel pré-moldado com Tris-glicina 8-16%. Transferiram-se então as proteínas por electrotransferência para membrana de nitrocelulose utilizando um protocolo padrão. Após bloqueio em leite magro a 4% em PBS, detectou-se proteína AAD-1 com anti-soro anti-AAD1 seguido de conjugados de cabra anti-coelho com HRP. Visualizou-se a proteína detectada com substrato de quimioluminescência ECL Western Analysis Reagent (Amersham n.º de cat. RPN 21058).

Exemplo 12 - Transformação de tabaco

Efectuou-se transformação de tabaco com *Agrobacterium tumefaciens* através de um método semelhante, mas não idêntico, a métodos publicados (Horsch *et al.*, 1988). Para proporcionar uma fonte de tecido para a transformação esterilizou-se a superfície de sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Kentucky 160) e plantou-se à superfície em meio TOB, que é um meio Murashige e Skoog isento de hormona (Murashige e Skoog, 1962) solidificado com ágar-ágar. Cultivaram-se as plantas durante 6-8 semanas num quarto de incubação iluminado a 28-30°C e recolheram-se as folhas de forma estéril para utilização no protocolo de transformação. Cortaram-se destas folhas, de forma estéril, bocados de aproximadamente um centímetro quadrado, excluindo a nervura mediana. Sedimentaram-se numa centrífuga culturas de estirpes de *Agrobacterium* (EHA101S contendo pDAB721, AAD-1 (v3) + PAT), cultivadas durante a noite num matraz num agitador colocado a 250 rpm a 28°C e ressuspenderam-se em sais Murashige e Skoog estéreis e ajustaram-se a uma densidade óptica de 0,5 a 600 nm. Mergulharam-se os bocados de folhas nesta suspensão

bacteriana durante aproximadamente 30 segundos, secaram-se em toalhas de papel estéreis e colocaram-se viradas para cima em meio TOB+ (meio Murashige e Skoog contendo ácido acético de indole 1 mg/L e benziladenina a 2,5 mg/L) e incubou-se no escuro a 28°C. Dois dias mais tarde mudaram-se os bocados de folhas para meio TOB+ contendo cefotaxima (Agri-Bio, North Miami, Florida) a 250 mg/L e glufosinato de amónio a 5 mg/L (ingrediente activo em Basta, Bayer Crop Sciences) e incubou-se a 28-30°C à luz. Mudaram-se os bocados de folhas para meio TOB+ fresco com cefotaxima e Basta duas vezes por semana durante as primeiras duas semanas e uma vez por semana daí em diante. Quatro a seis semanas após tratamento dos bocados de folhas com as bactérias, removeram-se desta preparação de tecidos as plantas pequenas provenientes de focos transformados e plantaram-se em meio TOB contendo cefotaxima a 250 mg/L e Basta a 10 mg/L em vasos Phytatray™ II (Sigma). Cresceram-se estas plântulas num quarto de incubação iluminado. Após 3 semanas retiraram-se cortes dos caules e transplantaram-se no mesmo meio. As plantas ficaram prontas para enviar para a estufa após 2-3 semanas adicionais.

Mudaram-se as plantas para a estufa por lavagem do ágar-ágar das raízes, transplantando para solo em vasos quadrados de 13,75 cm colocando o vaso num saco Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), colocando água da torneira na base do saco e colocando em luz indirecta numa estufa a 30°C durante uma semana.

Após 3-7 dias abriu-se o saco; fertilizaram-se as plantas e deixou-se crescer com o saco aberto até as plantas estarem aclimatadas à estufa, altura em que se removeu o saco. Cresceram-se as plantas em condições normais de estufa morna (30°C, 16 horas de dia, 8 horas de noite, mínimo de luz natural + suplementar = 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^1$).

Antes da propagação amostraram-se plantas T_0 para análise de ADN para determinar o número de cópias inseridas. Por conveniência, ensaiou-se gene *PAT* que estava ligado molecularmente a *AAD-1 (v3)*. Colocou-se tecido fresco em tubos

e liofilizou-se a 4°C durante 2 dias. Após secagem completa do tecido, colocou-se uma pérola de tungsténio (Valenite) no tubo e submeteram-se as amostras a 1 minuto de moagem a seco utilizando um moinho de bolas Kelco. Seguiu-se então o procedimento de isolamento de ADN DNeasy padrão (Qiagen, DNeasy 69109). Corou-se então uma alíquota do ADN extraído com Pico Green (Molecular Probes P7589) e leu-se no fluorómetro (BioTek) com padrões conhecidos para obter a concentração em ng/ μ l.

Diluíram-se as amostras de ADN para 9 ng/ μ l, seguidamente desnaturaram-se por incubação num termociclador a 95°C durante 10 minutos. Preparou-se então mistura Signal Probe utilizando a mistura de oligos proporcionada e MgCl₂ (Third Wave Technologies). Colocou-se uma alíquota de 7,5 μ l em cada poço da placa de ensaio Invader seguido de uma alíquota de 7,5 μ l de controlos, padrões e 20 ng/ μ l de amostras desconhecidas diluídas. Sobrepôs-se em cada poço 15 μ l de óleo mineral (Sigma). Incubaram-se então as placas a 63°C durante 1,5 horas e leu-se num fluorómetro (Biotek). Calcula-se a razão pela divisão da % de sinal relativamente à linha de base para a sonda alvo e a % de sinal relativamente à linha de base da sonda de controlo interno. Utilizou-se a razão de padrões de cópia conhecidos desenvolvidos e validados com análise de hibridação "southern", para identificar a cópia estimada de eventos desconhecidos (**tabela 27**).

Tabela 27. Eventos T ₀ de tabaco transformado com pDAB721 (AAD-1 (v3) + PAT) .				
Evento	N.º de cópias PAT ("Southern")	PCR da região de codificação para AAD-1	ELISA (μg AAD-1 / ml de extracto de planta)	Tolerância relativa T₀ pulverização com 2,4-D *
721(1)1	1	+	0,9	Média
721(2)1	nd	nd	0,6	Média
721(2)2	5	+	0,3	Reduzida
721(2)3	3	+	2,6	Média
721(2)5	5	+	4,1	Variável
721(2)6	3	+	0,5	Variável
721(2)8	5	+	0,3	Elevada

Tabela 27. Eventos T₀ de tabaco transformado com pDAB721 (AAD-1 (v3) + PAT) .

Evento	N.º de cópias PAT ("Southern")	PCR da região de codificação para AAD-1	ELISA (µg AAD-1 / ml de extracto de planta)	Tolerância relativa T ₀ pulverização com 2,4-D *
721(2)11	3	+	n/a	Elevada
721(2)12	3	+	4,1	Média
721(2)13	2	+	0,5	Média
721(2)14	5	+	0,2	Elevada
721(2)16	4	+	,3,2	Média
721(2)17	3	+	nd	Elevada
721(2)18	5	+	nd	Elevada
721(2)19	>10	+	nd	Reduzida
721(2)20	5	+	nd	Média
721(2)21	4	+	nd	Elevada
721(2)22	7	+	nd	Média
721(2)23	>10	+	nd	Variável
721(3)003	3	+	nd	Variável
721(3)008	2	+	nd	Elevada
721(3)012	1	+	nd	Elevada
721(3)4	2	+	0,5	Elevada
721(3)5	9	+	3,3	Elevada
721(3)6	4	+	7,1	Variável
721(3)9	2	+	1	Reduzida
721(3)10	3	+	0,6	Elevada
721(3)11	7	+	6	Reduzida
721(3)13	4	+	0,1	Elevada
721(3)014	2	+	0,1	Média

nd = não efectuado

Legenda: Tolerância relativa* Lesão com 2,4-D a 3200 g ae/ha (14DAT)

Reduzida	>50% de lesão
Média	20-50% de lesão
Elevada	<20% de lesão
Variável	inconsistente

Confirmaram-se as estimativas de número de cópias por análise "Southern" em vários eventos. Efectuaram-se as análises de transferência "Southern" com o ADN total obtido do kit Qiagen DNeasy. Submeteu-se um total de 2 µg de ADN a uma digestão durante a noite com NsiI e também HindIII para

pDAB721 para obter dados de integração. Após a digestão durante a noite correu-se uma alíquota de ~100 ng num gel de 1% para assegurar digestão completa. Após esta certeza processaram-se as amostras utilizando o mesmo protocolo que no exemplo 6 secção 11.

Ensaíram-se também todos os eventos para a presença do gene *AAD-1 (v3)* por PCR utilizando as mesmas amostras de ADN extraídas. Utilizou-se um total de 100 ng de ADN total como molde. Utilizou-se 20 mM de cada iniciador com o kit de Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Os iniciadores da PCR de região de codificação *AAD-1* foram (RdpAcodF ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:27) e (RdpAcodR CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:28). Efectuou-se a reacção de PCR no termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), submetendo as amostras a 94°C durante 3 minutos e 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Analisaram-se os produtos de PCR por electroforese num gel de agarose a 1% corado com EtBr. Regeneraram-se quatro das 12 linhagens clonais de cada um dos 30 eventos positivos em PCR e transferiram-se para a estufa.

Ensaiou-se uma planta representativa de cada um dos 19 eventos para expressão de *AAD-1 (v3)* por métodos de ELISA tal como anteriormente descrito. Todos os eventos ensaiados apresentaram níveis detectáveis de *AAD-1 (v3)* (**tabela 27**). A expressão de proteínas variou ao longo dos eventos.

Provocaram-se plantas T_0 de cada um dos 30 eventos com uma vasta gama de pulverização de 2,4-D nas plantas que tinham uma altura de 3-4 polegadas. As aplicações de pulverização foram efectuadas tal como descrito anteriormente utilizando um moto-pulverizador com um volume de pulverização de 187 L/ha. Aplicou-se sal de dimetilamina de 2,4-D (Riverside Corp) a 0, 50, 200, 800 ou 3200 g ae/ha a clones representativos de cada evento misturados com água desionizada. Cada tratamento foi replicado 1-3 vezes. Registaram-se as pontuações de lesão a 3 e 14 DAT. Cada evento ensaiado foi mais tolerante a 2,4-D do

que a linha de controlo não transformada KY160. Em vários eventos, ocorreu alguma torção do pecíolo auxínica inicial relacionada com herbicida a doses de 800 g ae/ha ou inferiores. Alguns eventos não foram lesionados a esta taxa (equivalente a 1,5X a taxa de campo). Todos os eventos sofreram algum nível de dano auxínico temporário 3 DAT quando tratados com 3200 g ae/ha. Ocorreu também alguma queimadura de folhas a esta taxa elevada devido à acidez da solução de pulverização. As tentativas futuras a taxas elevadas de 2,4-D foram tamponadas. Utilizou-se a resposta de plantas T_0 tratadas com 2,4-D a 3200 g ae/ha (~6X a taxa de campo) para diferenciar a tolerância relativa de cada evento em "baixa" (>50% de lesão a 14 DAT), "média" (20-50% de lesão), "elevada" (<20% de lesão). Alguns eventos tiveram respostas inconsistentes entre replicados e consideraram-se "variável" (**tabela 27**).

Verificação de tolerância elevada a 2,4-D.

Salvaram-se de cada evento dois a quatro indivíduos T_0 sobreviventes a taxas elevadas de 2,4-D e deixou-se autofertilizar na estufa para originar sementes T_1 . Escolheram-se duas linhas de tabaco AAD-1 (v3) (evento 721(2)-013.010 e 721(3)-008.005) da geração T_0 . Estratificou-se a semente T_1 e semeou-se em tabuleiros de selecção da mesma forma que *Arabidopsis* (exemplo 6.4), seguido de remoção selectiva de nulos não transformados nesta população segregada com glufosinato a 280 g ae/ha (selecção PAT). Transferiram-se os sobreviventes para vasos individuais de 3 polegadas na estufa. Estas linhas proporcionaram níveis elevados e médios de robustez a 2,4-D na geração T_0 . Antecipa-se uma consistência de resposta melhorada em plantas T_1 que não tenham vindo directamente de cultura de tecidos. Compararam-se essas plantas contra tabaco KY 160 de tipo selvagem. Pulverizaram-se todas as plantas por utilização de um moto-pulverizador a 187 L/ha. Pulverizaram-se as plantas numa gama de 70-4480 g ae/ha de sal de dimetilamina de 2,4-D (DMA), R-diclorprop e de uma mistura 50/50 dos dois herbicidas. Formularam-se todas as aplicações em tampão Hepes 200 mM

(pH 7,5). Replicou-se cada tratamento 4 vezes. Avaliaram-se as plantas aos dias 3 e 14 após tratamento. Atribuíram-se às plantas pontuações de lesão relativamente a nanismo, clorose e necrose. A geração T_1 está em segregação pelo que se espera alguma resposta variável devido à diferença em zigotia (**tabela 28**). Não se observou lesões com taxas inferiores a 1X as taxas de campo (560 g ae/ha) para 2,4-D ou R-diclorprop em qualquer dos eventos. Observou-se muito pequenas lesões mesmo até 8 vezes as taxas de campo (4480 g ae/ha) e tal expressou-se como nanismo, não como lesões de herbicida auxínico. Estes resultados indicaram que AAD-1 (v3) pode proporcionar tolerância de nível comercial mesmo em culturas de dicotiledóneas muito sensíveis a auxinas tal como tabaco. Estes resultados também mostram que a resistência pode ser proporcionada tanto contra herbicidas fenoxiauxínicos quirais (ácido 2,4-Diclorofenoxipropiónico) como aquirais (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) sozinhos ou em combinações de misturas em tanque.

Tabela 28. Resposta de plantas de tabaco T_1 que segregam AAD-1 a herbicidas fenoxiauxínicos.

Herbicida	KY160 - Tipo selvagem	721(2)013.010 (tolerância média na geração T_0)	721(3)008.005 (tolerância elevada na geração T_0)
	% média de lesão em replicados 14 DAT		
2,4-D DMA a 560 g ae/ha	75	5	0
2,4-D DMA a 1120 g ae/ha	80	5	2
2,4-D DMA a 2240 g ae/ha	90	5	0
2,4-D DMA a 4480 g ae/ha	95	5	5
R-diclorprop a 560 g ae/ha	70	5	0
R-diclorprop a 1120 g ae/ha	75	5	0
R-diclorprop a 2240 g ae/ha	88	5	0
R-diclorprop a 4480 g ae/ha	95	10	5
2,4-D DMA/R-diclorprop a 560 g ae/ha	80	5	5
2,4-D DMA/R-diclorprop a 1120 g ae/ha	80	10	10
2,4-D DMA/R-diclorprop a 2240 g ae/ha	95	15	15
2,4-D DMA/R-diclorprop a 4480 g ae/ha	95	15	15

Efectuou-se igualmente um ensaio de descendência a 100 plantas em cada uma das duas linhas AAD-1 (v3) (eventos 721(2)-013.010 e 721(3)-008.005). Estratificaram-se as sementes, semearam-se e transplantaram-se seguindo o procedimento anterior com a excepção de não se removerem as plantas nulas por selecção com Liberty. Pulverizaram-se então todas as plantas com 2,4-D DMA a 560 g ae/ha tal como descrito anteriormente. Após 14 DAT contaram-se as plantas resistentes e sensíveis. Ambos os eventos '013' e '008' segregaram para característica mendeliana dominante de local único (3R:1S) tal como determinado pelo teste do Qui quadrado. AAD-1 é hereditário como gene de resistência robusta a fenoxiauxina em várias espécies.

Demonstrar-se-á tolerância ao nível do campo por plantação de sementes T₁ ou T₂ na estufa, removendo selectivamente as plantas nulas por selecção com Liberty tal como descrito anteriormente e passando para trás as plântulas individuais em bases planas de transplante de 72 poços (Hummert International) em meio Metro 360 de acordo com as condições de crescimento anteriormente descritas. Transplantar-se-ão plantas individuais nos talhões de campo utilizando um plantador de vegetais industrial. Utilizar-se-á rega por gotejamento ou superior para manter as plantas em crescimento vigoroso. Assim que as plantas atingirem 6-12 polegadas de altura, pulverizar-se-ão as plantas de tabaco com uma vasta gama de fenoxiauxinas e classificar-se-ão como anteriormente. Os *stresses* ambientais são mais significativos em condições de campo; contudo, com base em experiências anteriores com milho transformado com AAD-1 (v3), espera-se que a resistência da estufa seja traduzida para o campo de forma robusta.

Exemplo 13 - Transformação de soja

Conseguiu-se o melhoramento de soja através de técnicas de transferência génica para características tais como tolerância a herbicida (Padgett *et al.*, 1995), modificação de aminoácidos (Falco *et al.*, 1995) e resistência a insectos (Parrott *et al.*, 1994). A introdução de características

exógenas em espécies de cultura necessita de métodos que permitirão produção rotineira de linhas transgênicas utilizando sequências de marcadores seleccionáveis contendo inserções simples. Os transgenes devem ser herdados como um único local funcional de modo a simplificar a reprodução. Foi relatada a entrega de genes exógenos a soja cultivada por bombardeamento com micro-projecteis de eixos de embriões zigóticos (McCabe *et al.*, 1988) ou de culturas embriogênicas somáticas (Finer e McMullen, 1991) e transformação mediada por *Agrobacterium* de plântulas cotilédones (Hinchee *et al.*, 1988) ou embriões zigóticos (Chee *et al.*, 1989).

Os produtos de transformação derivados de transformações mediadas por *Agrobacterium* tendem a apresentar inserções simples com número de cópias reduzido (Birch, 1991). Há benefícios e desvantagens associados com cada um dos três tecidos alvo investigados para transferência gênica em soja, eixos de embriões zigóticos (Chee *et al.*, 1989; McCabe *et al.*, 1988), cotilédone (Hinchee *et al.*, 1988) e culturas embriogênicas somáticas (Finer e McMullen, 1991). Estes últimos foram investigados extensivamente como um tecido alvo para transferência gênica directa. As culturas embriogênicas tendem a ser bastante prolíficas e podem manter-se ao longo de períodos prolongados. Contudo, têm-se associado esterilidade e aberrações cromossômicas dos produtos primários de transformação à idade das suspensões embriogênicas (Singh *et al.*, 1998) e assim parece ser necessário iniciar continuamente novas culturas para sistemas de transformação de soja utilizando este tecido. Este sistema necessita de um nível elevado de 2,4-D, a uma concentração de 40 mg/L, para iniciar o calo embriogênico e tal coloca um problema fundamental na utilização do gene *AAD-1 (v3)* dado que o local transformado não poderá ser desenvolvido adicionalmente com 2,4-D no meio. Assim, a transformação baseada no meristema é ideal para o desenvolvimento de plantas resistentes a 2,4-D utilizando *AAD-1 (v3)*.

13.1 - Método de transformação 1: transformação do nó do cotilédone de soja mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Os primeiros relatos de transformação de soja tiveram como alvo células do meristema na região do nó do cotilédone (Hinchee *et al.*, 1988) e multiplicação de rebentos a partir de meristemas apicais (McCabe *et al.*, 1988). No método de nó do cotilédone baseado em *A. tumefaciens*, a preparação de explantes e a composição de meios de cultura estimulam a proliferação de meristemas auxiliares no nó (Hinchee *et al.*, 1988). Não é claro se com estes tratamentos ocorre a iniciação de uma cultura de calo realmente desdiferenciada mas totipotente. A recuperação de clones múltiplos de um evento de transformação de um único explante e a recuperação pouco frequente de plantas quiméricas (Clemente *et al.*, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) indica uma origem de células única seguida de multiplicação da célula transgênica para produzir uma cultura de meristema transgênico em proliferação ou um rebento transformado uniformemente que apresenta multiplicação adicional de rebentos. O método de multiplicação de rebentos de soja, originalmente baseado em bombardeamento de micro-projecteis (McCabe *et al.*, 1988) e mais recentemente adaptado para transformação mediada por *Agrobacterium* (Martinell *et al.*, 2002), não apresenta aparentemente o mesmo nível ou tipo de desdiferenciação do que o método de nó do cotilédone porque o sistema se baseia na identificação bem-sucedida de quimeras de linha germinal. A gama de genótipos que foram transformados através do método de nó do cotilédone baseado em *Agrobacterium* está em aumento sustentado (Olhoft e Somers, 2001). Este método de meristema novo e multiplicação de rebento é menos limitado a genótipos específicos. Trata-se igualmente de um protocolo não baseado em 2,4-D que seria ideal para um sistema de selecção 2,4-D. Assim, o método de nó de cotilédone pode ser o método de eleição para desenvolver cultivares de soja resistentes a 2,4-D. Apesar de este método ter sido descrito já em 1988 (Hinchee *et al.*, 1988), foi apenas muito recentemente que foi otimizado para transformação de elevada frequência de rotina de vários genótipos de soja (Zhang *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2004).

13.1.1 - Preparação de *Agrobacterium*.

O plasmídeo pDAB721 contém o gene *AAD-1* (v3) sob o controlo do promotor *Ubi10* de *Arabidopsis*. Este plasmídeo também transporta o gene *PAT* sob o controlo do promotor de actina de arroz e codifica para uma enzima que degrada glufosinato que pode ser utilizada como agente de selecção para produtos de transformação. Este vector pode ser utilizado na experiência de transformação descrita seguidamente. A construção pDAB721 foi mobilizada para *Agrobacterium* estirpe EHA101S por electroporação.

As culturas de *Agrobacterium* apresentando pDAB721 utilizadas nas transformações podem ser cultivadas em meio YEP (peptona a 10 g/L, extracto de levedura a 5 g/L e NaCl a 5 g/L, pH 7,0). Sedimentam-se as culturas de *Agrobacterium* a baixa velocidade e ressuspendem-se em meio líquido SCM (consultar infra) até DO660 de 0,6 para utilização nas inoculações.

13.1.2 - Transformação de plantas.

Podem desinfectar-se as sementes dos génotipos públicos de soja "Thorne", "Williams82" ou "NE3001" através de uma lavagem de 20 minutos em lixívia comercial (NaClO) a 20% (v/v) com adição de 2 gotas de Liqui-Nox®. Devem enxaguar-se as sementes cinco vezes com água estéril em meio SHGA isento de hormonas e deixar-se germinar durante 5 dias a 24°C com um regime de 18/6 horas luz/escuro. O meio B5 consiste de micronutrientes e macronutrientes e vitaminas descrito por Gamborg *et al.* (1968) (Sigma, n.º de cat. G 5893, St. Louis). Todos os meios são solidificados com ágar-ágar lavado a 0,8% (p/v) (n.º de cat. Sigma A 8678). Alternativamente, determinados génotipos de soja podem ser submetidos a um procedimento de esterilização de superfície seca utilizando cloro gasoso (Cl₂) no qual se colocam as sementes maduras em placas de Petri de 100 x 25 mm em camada única utilizando cerca de 130 sementes por placa. Colocam-se aproximadamente 3-4 placas num exsiccador e

coloca-se em haste de modo a que todas as placas fiquem meio abertas e que haja espaço suficiente para um copo de 250 ml no meio do exsiccador. Enche-se o copo com 95 ml de lixívia comercial à qual se adiciona 5 ml de HCl concentrado (12 N) gota-a-gota ao longo das paredes do copo. Fecha-se imediatamente o exsiccador e deixa-se durante pelo menos 16 horas numa haste. Após esterilização fecham-se as placas e colocam-se numa câmara de fluxo laminar e abrem-se durante cerca de 30 minutos para remover qualquer excesso de Cl₂ gasoso. Germinam-se então as sementes tal como descrito anteriormente. As sementes com esterilização de superfície seca permanecerão estéreis à temperatura ambiente durante cerca de 2 semanas. Preparam-se os explantes para inoculação tal como descrito anteriormente (Hinchee *et al.*, 1988).

Os explantes devem ser inoculados durante 30 minutos. O meio de co-cultivo e de ressuspensão de *Agrobacterium* consiste de meio B5 suplementado com BAP a 1 mg/L, GA3 a 1 mg/L, sacarose a 3% (p/v), MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfónico) 20 mM, L-cisteína a 400 mg/L (Olhoft e Somers, 2001) pH 5,7, ditioneitol (DTT) 0,99 mM e acetossiringona (AS) 200 µM. Co-cultivaram-se os explantes durante 5 dias a 25°C. Após co-cultivo, lavaram-se os explantes no meio de co-cultivo contendo timentina a 100 mg/L e cefotaxima a 200 mg/L, sem MES e AS.

Devem colocar-se os explantes em meio de indução de rebentos e devem transferir-se de 14 em 14 dias durante um total de 28 dias antes de selecção com herbicida. O meio de indução de rebentos consiste de meio B5 sem diluição suplementado com BAP a 1,7 mg/L, timentina a 100 mg/L, cefotaxima a 200 mg/L, pH 5,7 e sacarose a 3% (p/v). Devem colocar-se os cotilédones com o adaxial para cima com a região do nó do cotilédone a virar para o meio, com adição de níveis crescentes de Basta (glufosinato de amónio a 2, 5, 6 e seguidamente 7 mg/L) ou níveis sub-letais de 2,4-D na gama de 10 mg a 400 mg/L de 2 em 2 semanas durante um total de 8 semanas.

Transferem-se subsequentemente os explantes em diferenciação para meio de alongamento de rebentos durante 4 a 10 semanas adicionais sob a mesma selecção de glufosinato ou sob menor pressão de selecção com 2,4-D na gama de 10 mg a 100 mg/L. O meio de alongamento consistiu de meio B5 (n.º de cat. Sigma M0404) com adição de ribósido de zeatina a 1 mg/L, IAA (ácido indole-3-acético) a 0,1 mg/L, GA3 a 0,5 mg/L, glutamina a 50 mg/L, asparagina a 50 mg/L e sacarose a 3% (p/v), pH 5,8. Os rebentos alongados devem ser enraizados, sem selecção adicional, em meio MS/B5 diluído para metade com vitaminas sem diluição mais NAA (ácido α -naftalenacético) a 0,5 mg/L ou IAA a 0,1 mg/L e sacarose a 2% (p/v).

Mantêm-se os antibióticos, timentina e cefotaxima, no meio ao longo da selecção. Transferem-se as culturas para meio fresco de 2 em 2 semanas. Aclimatam-se as plântulas durante 1 a 2 semanas antes da transferência para a estufa.

13.1.3 - Avaliação da descendência.

Deixam-se as plantas T_0 auto-fertilizarem na estufa para originar semente T_1 . Pulverizar-se-ão plantas T_1 (e na medida em que se produzam clones suficientes de planta T_0) com uma gama de doses de herbicida para determinar o nível de protecção de herbicida proporcionado pelos genes *AAD-1 (v3)* e *PAT* em soja transgénica. As taxas de 2,4-D utilizadas em plantas T_0 utilizarão tipicamente uma ou duas taxas selectivas na gama de 100-400 g ae/ha. A semente T_1 será tratada com uma dose de herbicida mais vasta na gama 50-3200 g ae/ha de 2,4-D. De igual modo, podem rastrear-se plantas T_0 e T_1 para resistência a glufosinato por tratamento pós-emergência com glufosinato a 200-800 e 50-3200 g ae/ha, respectivamente. A análise de expressão de proteína ocorrerá tal como descrito no exemplo 9 para *Arabidopsis* e milho. A determinação da hereditariedade de *AAD-1 (v3)* será efectuada utilizando segregação de descendência T_1 e T_2 relativamente a tolerância a herbicida.

13.2 - Método de transformação 2: Transformação mediada por *Agrobacterium* "sem agitação" de suspensão de células de soja não regeneráveis.

Cultivaram-se suspensões de células de soja DAS num ciclo de 3 dias com transferência de 10 ml do volume da suspensão que assentou para 115 ml de meio líquido fresco. Determinou-se o volume das células que assentaram deixando a suspensão celular assentar durante 2 min no matraz de 125 mL após agitação circular vigorosa e seguidamente retiram-se as células do fundo do matraz com uma pipeta de 10 ml de ponta larga. Transferiram-se então os matrizes para um agitador orbital a 140 rpm.

Transferiram-se alíquotas de 4 ml da suspensão de células a DO^{600} a 0,72 conjuntamente com acetossiringona (AS) 200 μ M para uma placa de Petri estéril 100x25. Adicionou-se suspensão de *Agrobacterium* EHA105 a uma densidade de DO^{650} de 1,2 num volume de 100 μ L e misturou-se bem. Agitou-se bem por rotação a mistura de *Agrobacterium* e suspensão de células e transferiu-se a placa para a câmara de crescimento no escuro na qual se manteve a temperatura a 25°C.

13.2.1 - Selecção de células de soja em suspensão e isolamento das colónias transformadas.

Após 4 dias de co-cultivo agitou-se por rotação a placa novamente para misturar bem a suspensão e transferiu-se uma alíquota de 1,5 ml para o meio de selecção e espalhou-se no meio de gel numa placa de Petri de 100x15 ml. O meio de selecção consistiu de meio B5 sem diluição suplementado com BAP a 1,7 mg/L, timentina a 100 mg/L, cefotaxima a 200 mg/L, pH 5,7 e sacarose a 3% (p/v) e completou-se o meio com glufosinato de amónio ao nível de 5 mg/L. Após 10 min a secar na hote incubaram-se as placas durante 4 semanas no escuro a 28°C. As colónias apareceram na selecção e transferiram-se um total de 11 colónias para meio fresco de 3 experiências diferentes e mantiveram-se durante 3-4 meses. Todas as 11 colónias resistentes produziram calos que cresceram em

glufosinato a 5 mg/L contendo meio de selecção. As células em suspensão não transformadas foram sensíveis quando plaqueadas em meio de glufosinato de amónio a 0,5 mg/l. Contudo, as colónias transformadas foram resistentes a 5x a concentração de glufosinato de amónio e mantiveram-se até 4 meses.

Amostraram-se eventos de calo para análises quando estes atingiram 2 a 3 cm de diâmetro. Analisaram-se pelo menos dois dos isolados de colónias, um de cada duas experiências diferentes, para expressão de proteína AAD1. As análises de ELISA e "Western" efectuadas nestes dois isolados apresentaram expressão positiva de proteínas AAD1. Tanto a análise ELISA (**tabela 29**) como a transferência "Western" (**figura 18**) em dois calos de soja independentes transformados com gene AAD-1 (v3) indicaram que as células do calo estão a expressar a proteína AAD-1 (v3). O ensaio ELISA em sanduíche detectou 0,0318% e 0,0102% de proteína solúvel total de AAD-1 (v3) em duas amostras diferentes de tecido de calo. Devido à sensibilidade e reactividade cruzada do anti-soro observaram-se várias bandas na transferência "western". Contudo, observou-se a banda específica de AAD-1 (v3) em ambas as amostras de calo mas não no tecido de tipo selvagem (negativo). As análises de PCR de região de codificação mostraram os produtos com o tamanho esperado das regiões de codificação AAD1 e PAT nestas colónias indicando que foram transformadas.

Evento	PCR de região de codificação de AAD-1	PCR de região de codificação de PAT	T SP (µg/mL)	AAD-1 (ng/mL)	% de expressão
1-1	+	+	1995,13	633,89	0,0318%
2-1	+	+	2018,91	205,92	0,0102%
Controlo negativo	-	-	2074,63	-1,22	-0,0001%

13.3 - Método de transformação 3: transformação de tecido de calo de soja embriogénico mediada por feixe de aerossol.

A cultura de tecido de calo de soja embriogénico e a aplicação do feixe foram tal como descrito na patente U.S. 6 809 232 (Held *et al.*).

Recolheram-se separadamente os calos embriogénicos de algumas variedades de Stine elite, incluindo 96E750, 96E94, 97E986, 96E144 e 96E692 para o centro de placas de B1-30 3Co5My ou B1-30 3Co5My0.25PA0.5K três dias após transferência para meio fresco. Aplicou-se então ao tecido o feixe de pDAB3295 utilizando ADN linearizado a uma concentração de aproximadamente 0,2 µg/ml. Após aplicação do feixe, transferiram-se os calos embriogénicos para B1-30 3Co5My ou B1-30 3Co5My0.25PA0.5K frescos para uma passagem de um mês. Transferiu-se então o tecido para meio selectivo contendo bialafos a 1 mg/l. Com bialafos a selecção manteve-se tipicamente a 1 mg/l para as primeiras duas passagens de um mês e seguidamente aumentou para 2 mg/l durante os três a sete meses seguintes. Identificaram-se os eventos transgénicos quando o tecido de calo gerado pelas experiências de transformação se começou a organizar e desenvolveu para estruturas embriogénicas enquanto ainda estava em meio selectivo contendo 2,4-D mais bialafos. Uma vez identificadas, regeneraram-se as estruturas em maturação para plantas de acordo com o protocolo seguinte: transferiram-se estruturas embriogénicas de B1-30 3Co5My ou B1-30 3/co5My0.25PA0.5K para meio B3. Após 3 a 4 semanas de crescimento em meio B3 transferiram-se as estruturas individuais para meio fresco. Após mais 3 a 4 semanas transferiram-se os embriões em maturação para meio B5G e colocaram-se à luz. Transferiram-se os embriões que tinham alongado e produzido raízes para tubos contendo 1/2 de meio B5G nos quais continuaram o seu desenvolvimento para plântulas; e removeram-se essas plântulas dos tubos e colocaram-se em vasos.

Ensaíram-se variações dos meios referidos na **tabela 30**, e.g., B1-30 3Co5My, que foi produzido por adição de água de

coco a 3% e mio-inositol a 5 g/l a B1-30. Outras variações incluíram: B1-30 3Co5My0.25 PA0.5K que continha meio basal B1-30 mais água de coco a 3%, mio-inositol a 5 g/l, ácido fítico a 0,25 g/l e KH_2PO_4 a 0,5 g/l adicional e 1/2 de B5G que continha todos os ingredientes do meio B5G a metade da concentração.

Tabela 30. Meios de crescimento para soja			
	Ingredientes em 1 litro		
	B1-30	B3	B5G
Sais Ms	4,43 g	4,43 g	
Sais B5			3,19 g
NaEDTA	37,3 mg	37,3 mg	37,3 mg
2,4-D	30 mg		
Carvão activado		5 g	
Phytagar	8g	8g	
Gelrite			2g
pH	5,8	5,8	5,8

Exemplo 14 - Permitir incorporação de AAD-1 (v3) em algodão

14.1 - Protocolo de transformação de algodão.

Submetem-se sementes de algodão (genótipo Co310) a esterilização superficial em etanol a 95% durante 1 minuto, enxaguam-se, esterilizam-se com lixívia comercial a 50% durante vinte minutos e seguidamente enxaguaram-se 3 vezes com água destilada estéril antes da germinação em meio G (**tabela 31**) em vasos Magenta GA-7 e manteve-se com elevada intensidade luminosa de 40-60 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ com o fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro a 28°C.

Isolam-se quadrados (~5mm) de segmentos de cotilédone de plântulas com 7-10 dias em líquido de meio líquido M (**tabela 31**) em placas de Petri (Nunc, n.º 0875728). Tratam-se os segmentos cortados com uma solução de *Agrobacterium* (durante 30 minutos) e seguidamente transfere-se para meio M semi-sólido (**tabela 31**) e submete-se a co-cultivo durante 2-3 dias. Após co-cultivo transferem-se os segmentos para meio MG (**tabela 31**). Utiliza-se carbenicilina como o antibiótico para matar *Agrobacterium* e o glufosinato de amónio é o agente

de selecção que permitirá crescimento apenas das células que contêm o gene transferido.

Preparação de *Agrobacterium*. Inocular 35 ml de meio Y (**tabela 31**) (contendo estreptomicina (solução-mãe a 100 mg/ml) e eritromicina (solução-mãe a 100 mg/ml)) com uma ansa de bactérias para crescer durante a noite no escuro a 28°C com agitação a 150 rpm. No dia seguinte deitar a solução de *Agrobacterium* num tubo oakridge estéril (Nalge-Nunc, 3139-0050) e centrifugar em Beckman J2-21 a 8 000 rpm durante 5 minutos. Rejeitar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 25 ml de M líquido (**tabela 31**) e submeter a vortex. Colocar uma alíquota num tubo de cultura de vidro (Fisher, 14-961-27) para leitura Klett (Klett-Summerson, modelo 800-3). Diluir a nova suspensão utilizando meio líquido M até uma leitura no medidor Klett de 10^8 unidades formadoras de colónias por mL com um volume total de 40 ml.

Após três semanas isola-se o calo dos segmentos cotilédones e transfere-se para meio MG fresco. Transfere-se o calo durante 3 semanas adicionais em meio MG. Transfere-se então o calo para meio CG (**tabela 31**) e transfere-se novamente para meio de selecção fresco após três semanas. Após outras três semanas transfere-se o tecido do calo para meio D (**tabela 31**) isento de reguladores de crescimento de planta para indução de calo embriogénico. Após 4-8 semanas neste meio, forma-se calo embriogénico e pode distinguir-se de calo não embriogénico pela sua cor branca amarelada e células granulares. Os embriões começam a regenerar dentro de pouco tempo e têm uma cor verde distintiva.

Isolam-se os embriões maiores e bem desenvolvidos e transferem-se para meio DK (**tabela 31**) para desenvolvimento de embriões. Após 3 semanas (ou quando os embriões se desenvolveram) transferem-se os embriões germinados para meio fresco para desenvolvimento de rebentos e raízes. Após 4-8 semanas transferem-se todas plantas bem desenvolvidas para o solo e crescem-se até à maturidade. Após um par de meses a

planta cresceu até poder ser pulverizada para determinar se tinha resistência a 2,4-D.

Tabela 31. Meio para transformação de algodão

Ingredientes em 1 litro	G	M líquido	M	MG	CG	D	DK	Y
Sais LS (5X)	200 ml							
Glucose		30 gramas	30 gramas	30 gramas	30 gramas	20 gramas		
B5 vit modificado (1000x)	1 ml	10 ml	1 ml					
Cinetina (1mM)		1ml	1 ml	1 ml	4,6 ml		0,5ml	
2,4-D (1mM)		1 ml	1 ml	1 ml				
Ágar-ágar	8 gramas		8 gramas					
Sais DKW (D190)						1 pacote	1 pacote	
Mio-inositol (100x)						1 ml	10 ml	
Sacarose a 3%	30 gramas						30 gramas	10 gramas
NAA								
Carbenicilina (250 mg/ml)				2 ml	0,4 ml			
GLA (10 mg/ml)				0,5 ml	0,3 ml			
Peptona								10 gramas
Extracto de levedura								10 gramas
NaCl								5 gramas

14.2 - Especificidades da experiência.

Para esta experiência trataram-se 500 segmentos de cotilédones com pDAB721. Dos 500 segmentos tratados, 475 tinham calo isolado aquando da selecção (95% de frequência de transformação). Selecionou-se o calo em glufosinato de amónio, devido à inclusão do gene *PAT* na construção, dado que já tinha sido desenvolvido um esquema de selecção. Iniciou-se a análise da linha de calo na forma de PCR e Invader para determinar os padrões de inserção e assegurar que o gene estava presente na etapa de calo e seguidamente enviaram-se as linhas de calo que estavam embriogénicas para análise de "Western".

14.3 - Resultados da análise de calo.

O objectivo da análise é eliminar quaisquer linhas que não tenham o PTU completo, que não apresentem expressão ou que tenham um número de cópias elevado, de modo a que essas linhas não sejam regeneradas. Das 475 linhas de calo transformadas com pDAB721, enviaram-se 306 para análise de PCR e ensaio

Invader (**tabela 32**). Muito poucas linhas foram negativas em PCR. Os resultados de Invader não estão completos nesta altura porque algumas amostras tinham quantidades de ADN reduzidas quando foram extraídas e estas foram ressubmetidas. Contudo, ao dados correntes de Invader mostram que apenas poucas das linhas submetidas apresentaram número de cópias elevado (número de cópias >2) (**tabela 32**). Devido ao elevado número de linhas que passaram na análise foi necessário diminuir o número de linhas de calo embriogénico que foram mantidas devido ao volume. Enviaram-se noventa linhas para a análise "Western" e oito dessas foram negativas. A análise "Western" mostrou expressão elevada da maioria das linhas (**tabela 32**). Estão a manter-se oitenta e duas linhas de calo embriogénico para regeneração de planta com base nos resultados da análise (e resultados pendentes).

Tabela 32. Análise de calos de algodão							
Linha	N.º de cópias	PTU	"Western"	Linha	N.º de cópias	PTU	"Western"
1	2	pos	***	43	1	pos	*****
2	1	pos	***	44	Pouco ADN	pos	*****
3	1	pos	***	45	1	pos	*****
4	2	pos	***	46	2	pos	*****
5	1	pos	***	47	1	pos	***
6	1	pos	neg	48	1	pos	***
7	1	pos	*****	49	3	pos fraco	neg
8	1	pos	*****	50	1	pos	****
9	2	pos	*	51	4	pos	neg
10	1	pos	*	52	2	pos	****
11	1	pos	*****	53	1	pos	***
12	1	pos	*	54	1	pos	****
13	1	pos	*	55	1	pos	neg
14	1	pos	**	56	5	pos	*
15	1	pos	****	57	2	pos fraco	neg
16	1	pos	*****	58		pos	****
17	1	pos	*	59	2	pos	****
18	1	pos	***	60	5	pos	*****
19	1	pos	**	61	1	pos	**
20	1	pos	*****	62	1	pos	**
21	2	pos	*****	63	1	pos	***
22	1	pos	*****	64	1	pos	***
23	1	pos	*****	65	3	pos	****
24	4	pos	* ou neg	66	5	pos	*
25	1	pos	****	67	6	pos	*
26	1	pos	****	68	Pouco ADN	pos	neg
27	Pouco ADN	pos	*****	69	Pouco ADN	pos	****
28	Pouco ADN	pos	**	70	Pouco ADN	pos	**
29	Pouco ADN	pos	*****	71	Pouco ADN	pos fraco	**
30	17	pos	*	72	Pouco ADN	pos	****
31	Pouco ADN	pos	*****	73	Pouco ADN	neg	***
32	Pouco ADN	pos	*****	74	Pouco ADN	pos fraco	***
33	Pouco ADN	pos	****	75	Pouco ADN	pos	***
34	Pouco ADN	pos fraco	*****	76	Pouco ADN	pos	Neg
35	Pouco ADN	pos	****	77	Pouco ADN	pos fraco	****
36	Pouco ADN	pos	neg	78	Pouco ADN	pos	****
37	Pouco ADN	pos	****	79	1	pos	**
38	Pouco ADN	neg	*****	80	Pouco ADN	pos	***
39	1	pos	****	81	Pouco ADN	pos	***
40	Pouco ADN	pos	*	82	Pouco ADN	pos	***
41	Pouco ADN	pos	*	83	Pouco ADN	neg	****
42	Pouco ADN	pos	**	84	Pouco ADN	pos	***
padrão	AAD1	5ug/ml	*****	85	Pouco ADN	pos	**
padrão	AAD1	0,5ug/ml	**	86	Pouco ADN	pos	*

14.4 - Regeneração de planta.

Duas linhas de algodão *AAD-1 (v3)* produziram plantas de acordo com o protocolo anterior que foram enviadas para a estufa. Para demonstrar que o gene *AAD-1 (v3)* confere resistência a 2,4-D em algodão, pulverizaram-se tanto a planta de algodão *AAD-1 (v3)* como as plantas de algodão de tipo selvagem com um moto-pulverizador a 187 L/ha. Pulverizaram-se as plantas com 2,4-DMA a 560 g ae/ha formulado em tampão Hepes 200 mM (pH 7,5). Avaliaram-se as plantas aos dias 3, 7 e 14 após tratamento. Atribuíram-se às plantas pontuações de lesão relativamente a nanismo, clorose e necrose. Considera-se que as plantas às quais se atribuiu uma pontuação de lesão de 90% ou superior estão mortas. Três dias após o tratamento (DAT) a planta de tipo selvagem começou a apresentar epinastia e recebeu uma classificação de 15%; contrariamente, a planta *AAD-1 (v3)* apresentou 0% de lesão. A 7 DAT a epinastia continuou no tipo selvagem e os novos rebentos começaram a ficar castanhos. Recebeu uma classificação de 50% a este ponto temporal. A 14 DAT a planta *AAD-1 (v3)* ainda não apresentava lesões, enquanto o tipo selvagem estava gravemente enfezada e as novas áreas de crescimento estavam castanhas e enrugadas. Assim, o tipo selvagem recebeu uma classificação de 90% a 14 DAT.

Este estudo demonstra que o gene *AAD-1 (v3)* em algodão proporciona tolerância substancial a 2,4-D até pelo menos 560 g ae/ha.

Exemplo 15 - Transformação com *Agrobacterium* de outras culturas

Considerando a presente divulgação, podem transformar-se culturas adicionais de acordo com o presente invento utilizando técnicas que são conhecidas na especialidade. Para transformação mediada por *Agrobacterium* de centeio, consultar, e.g., Popelka e Altpeter (2003). Para transformação mediada por *Agrobacterium* de soja, consultar, e.g., Hinchee et al., 1988. Para transformação mediada por *Agrobacterium* de sorgo,

consultar, e.g., Zhao et al., 2000. Para transformação mediada por *Agrobacterium* de cevada, consultar, e.g., Tingay et al., 1997. Para transformação mediada por *Agrobacterium* de trigo, consultar, e.g., Cheng et al., 1997. Para transformação mediada por *Agrobacterium* de arroz, consultar, e.g., Hiei et al., 1997.

Fornecem-se seguidamente os nomes latinos para estas e outras plantas. Deve esclarecer-se que se podem utilizar estas e outras técnicas de transformação (não de *Agrobacterium*) para transformar AAD-1 (v3), por exemplo, para estas e para outras plantas, incluindo entre outras, milho (*Gramineae Zea mays*), trigo (*Pooideae Triticum* spp.), arroz (*Gramineae Oryza* spp. e *Zizania* spp.), cevada (*Pooideae Hordeum* spp.), algodão (*Abroma Dicotyledoneae*, *Abroma augusta* e *Malvaceae Gossypium* spp.), soja (*Soya Leguminosae Glycine max*), beterraba açucareira (*Chenopodiaceae Beta vulgaris altissima*), cana-de-açúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Solanaceae Lycopersicon esculentum* e outras spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* e outras spp. e *Cyphomandra betacea*), batata, batata-doce, centeio (*Pooideae Secale* spp.), pimentos (*Solanaceae Capsicum annuum, sinense* e *frutescens*), alface (*Compositae Lactuca sativa, perennis* e *pulchella*), couve, aipo (*Umbelliferae Apium graveolens*), beringela (*Solanaceae Solanum melongena*), sorgo (todas as espécies de sorgo), alfalfa (*Leguminosae Medicago sativum*), cenoura (*Umbelliferae Daucus carota sativa*), feijões (*Leguminosae Phaseolus* spp. e outros géneros), aveia (*Avena Sativa* e *Strigosa*), ervilhas (*Leguminosae Pisum, Vigna* e *Tetragonolobus* spp.), girassol (*Compositae Helianthus annuus*), abóbora (*Dicotyledoneae Cucurbita* spp.), pepino (*Dicotyledoneae genera*), Tabaco (*Solanaceae Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Cruciferae Arabidopsis thaliana*), relva (*Lolium, Agrostis* e outra famílias) e trevo (*Leguminosae*). Tais plantas com genes AAD-1 (v3), por exemplo, incluem-se no presente invento.

Exemplo 16 - Junção de AAD-1 (v3) com o gene de resistência a herbicida AHAS

Descreve-se no exemplo 7.9. a junção de AAD-1 (v3) com o gene de resistência a herbicida AHAS

Exemplo 17 - Evidência adicional dos resultados surpreendentes: AAD-1 contra AAD-2

17.1 - Clonagem inicial de AAD-2 (v1).

Identificou-se outro gene da base de dados NCBI (consultar o sítio ncbi.nlm.nih.gov; n.º de acesso AP005940) como um homólogo com apenas 44% de identidade de aminoácidos com *tfdA*. Refere-se aqui este gene como AAD-2 (v1) por coerência. Identificou-se a percentagem de identidade, primeiro por tradução das sequências de ADN de AAD-2 e *tfdA* (SEQ ID NO:12 e n.º de acesso GENBANK M16730, respectivamente) para proteínas (SEQ ID NO:13 e n.º de acesso GENBANK M16730, respectivamente) e seguidamente utilizando ClustalW no pacote de utilitários VectorNTI para efectuar o alinhamento de sequência múltiplas.

Obteve-se a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* contendo o gene AAD-2 (v1) de Northern Regional Research Laboratory (NRRL, n.º de estirpe B4450). Reviveu-se a estirpe liofilizada de acordo com o protocolo NRRL e armazenou-se a -80°C em glicerol a 20% para utilização do laboratório como estirpe bacteriana de Dow DB 663. A partir desta solução-mãe congelada riscou-se então uma placa de ágar-ágar com soja triptica usando uma ansa de células para isolamento e incubou-se a 28°C durante 3 dias. Utilizou-se uma colónia única para inocular 100 ml de meio líquido de soja triptica num matraz de três aletas de 500 mL e incubou-se durante a noite a 28°C num agitador de modelo chão a 150 rpm. Isolou-se ADN total desta cultura com o protocolo Gram-negativo do kit DNeasy da Qiagen (n.º de cat. Qiagen 69504). Conceberam-se os seguintes iniciadores para amplificar o gene alvo do ADN genómico, Directo: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3' [(brjap 5'(speI) SEQ ID NO:14 (adição do local de restrição Spe I e local de ligação ao ribossoma (RBS))] e Inverso: 5'

TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC TGC TGC TGC 3' [(br jap 3' (xho1) SEQ ID NO:15 (adição de um local Xho I)].

Estabelecem-se reacções de cinquenta microlitros como se segue: Tampão Fail Safe 25 µl, 1 µl de cada iniciador (50 ng/µl), gADN 1 µl (200 ng/µl), H₂O 21 µl, Taq polimerase 1 µl (2,5 unidades/µl). Utilizaram-se três tampões Fail Safe A, B e C em três reacções independentes. Efectuou-se então PCR nas seguintes condições: 95°C 3,0 minutos ciclo de desnaturação pelo calor; 95°C 1,0 minuto, 50°C 1,0 minuto, 72°C 1,5 minutos, durante 30 ciclos; seguido por um ciclo final de 72°C 5 minutos utilizando o sistema de PCR FailSafe (n.º de cat. Epicenter FS99100). O produto de PCR resultante com ~1 kb foi clonado em pCR 2.1 (n.º de cat. Invitrogen K4550-40) seguindo o protocolo incluso, com *E. coli* TOP10F' como a célula hospedeira quimicamente competente, para verificação da sequência de nucleótidos.

Repicaram-se dez das colónias brancas resultantes para 3 µl de meio líquido Luria + ampicilina a 1000 µg/ml (LB Amp) e cultivaram-se durante a noite a 37°C com agitação. Purificaram-se plasmídeos de cada cultura utilizando o kit de mini-preparação Nucleospin Plus Plasmid (n.º de cat. BD Biosciences K3063-2) e seguindo o protocolo incluso. Completou-se a digestão de restrição dos ADN isolados para confirmar a presença do produto de PCR no vector pCR2.1. Digeriu-se o ADN plasmídico com a enzima de restrição EcoRI (n.º de cat. New England Biolabs R0101S). Efectuou-se a sequenciação com o kit Quick Start de Beckman CEQ (n.º de cat. Beckman Coulter 608120) utilizando os iniciadores de M13 Directo [5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'] (SEQ ID NO:16) e Inverso [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEQ ID NO:17), segundo as instruções do fabricante. A esta sequência de gene e sua proteína correspondente deu-se a nova designação geral AAD-2 (v1) para coerência interna.

17.2 - Conclusão do vector binário AAD-2 (v1).

Amplificou-se por PCR o gene *AAD-2 (v1)* a partir de pDAB3202. Durante a reacção de PCR fizeram-se alterações nos iniciadores para introduzir os locais de restrição AflIII e SacI no iniciador 5' e no iniciador 3', respectivamente. Utilizaram-se os iniciadores "NcoI de Brady" [5' TAT ACC ACA TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEQ ID NO:18) e "SacI de Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CAC 3'] (SEQ ID NO:19) para amplificar um fragmento de ADN utilizando o sistema de PCR Fail Safe (Epicentre). Clonou-se o produto de PCR no vector de clonagem pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen) e verificou-se a sequência com os iniciadores M13 Directo e M13 Inverso utilizando os reagentes de sequenciação "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter. Os dados de sequenciação identificaram um clone com a sequência correcta (pDAB716). Clonou-se então o fragmento AflIII/SacI do gene *AAD-2 (v1)* no vector NcoI/SacI pDAB726. Verificou-se a construção resultante (pDAB717); promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: *AAD-2 (v1)*: Nt OSM3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR com digestões de restrição (com NcoI/SacI). Clonou-se esta construção no binário pDAB3038 na forma de um fragmento de ADN NotI - NotI. Efectuou-se a digestão de restrição da construção resultante (pDAB767); promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: *AAD-2 (v1)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR (com NotI, EcoRI, HindIII, NcoI, PvuII e SalI) para verificação da orientação correcta. Utilizou-se então a construção completa (pDAB767) para transformação em *Agrobacterium*.

17.3 - Comparação das especificidades de substrato de AAD-2 (v1) e AAD-1 (v1)

Ensaiou-se um extracto de *E. coli* que expressa *AAD-2 (v1)* (pDAB3202) preparado como no exemplo 11 para actividade de quatro herbicidas, 2,4-D, (R,S)-diclorprop, (R,S)-haloxifop e (R)-haloxifop (todos a uma concentração final de 0,5 mM) utilizando 3 µl (42 µg) de extracto de *E. coli* por ensaio com um período de ensaio de 15 min. A **figura 22** demonstra que a

actividade relativa de AAD-2 (v1) nos substratos foi 2,4-D = diclorprop > (R,S)-haloxifop >> (R)-haloxifop. Assim AAD-2 (v1) difere de AAD-1 (v1) por ter um nível de actividade semelhante em 2,4-D e em diclorprop (enquanto a actividade de AAD-1 (v1) em 2,4-D é ~10% da de diclorprop). AAD-2 (v1) também difere de AAD-1 (v1) por ser incapaz de actuar em (R)-haloxifop. A **tabela 33** apresenta dados de substratos adicionais ensaiados com AAD-1 (v1) e AAD-2 (v1) que confirmam que AAD-2 (v1) é específico para enantiómeros (S) de substratos, contrariamente a AAD-1 (v1) que é específico para enantiómeros (R). Em outro ensaio, verificou-se que AAD-2 (v1) era diferente de AAD-1 (v1) por libertar pouco ou nenhum fenol detectável de sulfonato de 2,4-D (no qual um grupo sulfonato substitui o carboxilato de 2,4-D) enquanto AAD-1 (v1) produz níveis significativos de fenol a partir deste composto (~25% de 2,4-D.)

Tabela 33. Comparação de actividades AAD1 e AAD2 em diferentes substratos. Ensaíram-se os substratos a 0,5 mM durante 15 min em MOPS 25 mM pH 6,8, Fe²⁺ 200 µM, ascorbato de Na 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM utilizando 4 µl de extracto de AAD1 (32 µg de proteína) ou 3 µl de extracto de AAD2 (42 µg de proteína).

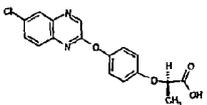
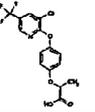
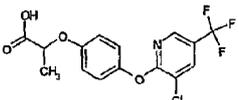
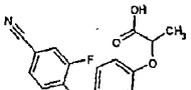
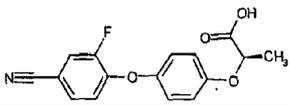
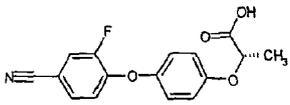
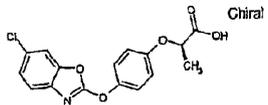
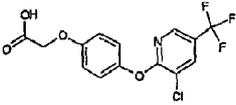
ESTRUTURA	ID de registo	Composto	Enantiómero	A510	
				AAD1	AAD2
	18706	quizalofop	R	0,27	0,01
	8671	haloxifop	R	0,12	0
	66905	haloxifop	R, S	0,1	0,3
	14623	ci-halofop	R, S	0,12	0,1

Tabela 33. Comparação de actividades AAD1 e AAD2 em diferentes substratos. Ensaaiaram-se os substratos a 0,5 mM durante 15 min em MOPS 25 mM pH 6,8, Fe^{2+} 200 μM , ascorbato de Na 200 μM , α -cetogluturato 1 mM utilizando 4 μl de extracto de AAD1 (32 μg de proteína) ou 3 μl de extracto de AAD2 (42 μg de proteína).

ESTRUTURA	ID de registo	Composto	Enantiómero	A510	
				AAD1	AAD2
	14603	ci-halofof	R	0,14	0
	7466	ci-halofof	S	0	0,15
	11044492	fenoxaprop	R	0,14	0
	43865	acetato de haloxifop	-	0	0,22

Compararam-se as cinéticas enzimáticas de AAD-1 (v1) e AAD-2 (v1) parcialmente purificadas utilizando 2,4-D como substrato. Consultar a **figura 19**. Os valores de K_m para 2,4-D foram 97 e 423 μM para AAD-1 (v1) e AAD-2 (v1) respectivamente e os valores de $V_{m\acute{a}x}$ aparente foram 0,11 e 0,86 unidades de A_{510} , respectivamente (**tabela 34**). Devido a se terem utilizado quantidades equivalentes de enzima nos ensaios (tal como determinado por análise de SDS-PAGE), pode concluir-se que o k_{cat} de AAD-2 (v1) para 2,4-D é cerca de 8 vezes superior ao valor para AAD-1 (v1) e k_{cat}/K_m é 2 vezes superior. Assim AAD-2 (v1) é significativamente mais eficaz na clivagem de 2,4-D *in vitro* do que AAD-1 (v1). Tal contrasta surpreendentemente com o que se verificou na planta e que se relata seguidamente, em que plantas que expressam AAD-1 (v1) são significativamente melhores a conferir resistência a 2,4-D relativamente a AAD-2 (v1).

Tabela 34. Comparação dos valores de Km e "Vmáx" para ariloxialcanoato-dioxigenases (AAD) de pDAB3202 (AAD-2) e pDAB3203 [AAD-1 (v1)] com diferentes herbicidas substratos:

Enzima	Composto	Km (μM) \pm EP	Vmáx (unidades de A510)	Km/Vmáx (unidades arbitrárias)
AAD-2	2,4-D	423 (\pm 1)	0,86	2,03
AAD-1 (v1)	2,4-D	97 (\pm 21)	0,11	1,16

Notas: Efectuaram-se ensaios em MOPS pH 6,75 + α -cetogluturato 1 mM + ascorbato de Na 0,1 mM + Fe²⁺ 0,1 mM e os fenóis libertados foram detectados colorimetricamente utilizando 4-aminoantipirina/ferricianeto.

17.4 - Avaliação de *Arabidopsis* transformada.

Deixou-se secar durante 7 dias à temperatura ambiente sementes T₁ recentemente colhidas e transformadas com gene [AAD-1 (v2)] nativo, [AAD-1 (v3)] optimizado para planta ou AAD-2 (v1). Semeou-se a semente T₁ em tabuleiros de germinação de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), recebendo cada um alíquotas de 200 mg de semente T₁ estratificada (~10 000 sementes) que tinham sido previamente suspensas em 40 ml de solução de agarose a 0,1% e armazenadas a 4°C durante 2 dias para completar os requisitos de dormência vegetativa e assegurar germinação síncrona das sementes.

Cobriu-se Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) com vermiculite fina e sub-irrigou-se com solução de Hoagland até estar molhado e seguidamente deixou-se drenar por gravidade. Semearam-se em vermiculite homogeneamente alíquotas de 40 ml de semente estratificada com uma pipeta e cobriu-se com coberturas de humidade (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) durante 4-5 dias. Removeram-se as coberturas 1 dia antes da selecção dos produtos de transformação iniciais utilizando pulverização com glufosinato pós-emergência (selecção para co-transformação com gene PAT).

Cinco a seis dias após plantar (DAP) e mais uma vez a 10 DAP, pulverizaram-se plantas T₁ (cotilédone e estágio de 2-4 folhas, respectivamente) com uma solução a 0,2% de herbicida Liberty (glufosinato a 200 g ae/L, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a um volume de pulverização de 10 ml/tabuleiro

(703 L/ha) utilizando uma ponta de pulverização de ar comprimido DeVilbiss para entregar um caudal efectivo de 280 g ae/ha de glufosinato por aplicação. Identificaram-se os sobreviventes (plantas em crescimento activo) 5-7 dias após a pulverização final e transplantaram-se individualmente para vasos de 3 polegadas preparados com meio de vaso (Metro Mix 360). Cobriram-se as plantas transplantadas com coberturas de humidade durante 3-4 dias e colocaram-se numa câmara de cultura a 22°C tal como anteriormente. Removeram-se subsequentemente as coberturas e deslocaram-se as plantas para a estufa (22±5°C, 50±30% de HR, 14 horas de luz:10 escuro, mínimo 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^1$ luz natural + suplemento) pelo menos 1 dia antes do ensaio relativamente à capacidade de AAD-1 (v3), AAD-1 (v2) ou AAD-2 (v1) proporcionarem resistência a herbicida fenoxiauxínico.

Confirmou-se expressão de proteína PAT em plantas T₁ individuais aleatórias, anteriormente seleccionadas para resistência a glufosinato, utilizando um kit de ELISA PAT (N.º 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE) para confirmar de forma não destrutiva a fidelidade do processo de selecção (protocolo do fabricante). Atribuíram-se então aleatoriamente as plantas a várias taxas de 2,4-D (50-800 g ae/ha).

Aplicaram-se por moto-pulverizador aplicações de herbicida num volume de pulverização de 187 L/ha. O 2,4-D utilizado foi a formulação comercial de sal de dimetilamina (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO) misturada em tampão Tris 200 mM (pH 9,0).

17.5 - Resultados de selecção de plantas transformadas.

Efectuaram-se as primeiras transformações de *Arabidopsis* utilizando AAD-1 (v3). Seleccionaram-se primeiro os produtos de transformação T₁ da linha de base de semente não transformada utilizando um esquema de selecção de glufosinato. Rastrearam-se mais de 400 000 sementes T₁ e identificaram-se 493 plantas resistentes a glufosinato (gene PAT) resultando

numa frequência transformação/selecção de 0,12%. Dependendo do lote de sementes ensaiado, tal variou na gama 0,05-0,23% (consultar **tabela 15** do exemplo 6.5 anterior). Seleccionou-se igualmente um lote pequeno de sementes transformadas com AAD-1 (v2) nativo utilizando o agente de selecção glufosinato. Identificaram-se duzentos e setenta e oito indivíduos T₁ resistentes a glufosinato de entre 84 000 sementes rastreadas (0,33% de frequência transformação/selecção). Surpreendentemente, as transformações *Arabidopsis* utilizando o gene AAD-2 (v1) nativo proporcionaram uma frequência de transformação muito baixa quando seleccionadas para tolerância a glufosinato (função de marcador seleccionável de PAT). Rastrearam-se aproximadamente 1,3 milhões de sementes e apenas se recuperaram 228 produtos de transformação de glufosinato, resultando numa frequência transformação/selecção de 0,018% (consultar **tabela 15**). A frequência de transformação em AAD-2 (v1) nativo foi de apenas 6% do verificado para AAD-1 (v2) nativo. O gene AAD2 (v1) nativo foi subsequentemente optimizado sinteticamente, clonado e transformado como pDAB3705 para *Arabidopsis* utilizando métodos descritos anteriormente (consultar exemplo 5). O gene AAD2 (v2) (SEQ ID NO:29, que codifica SEQ ID NO:30) optimizado para planta levou a uma frequência de selecção normal para T₁ de *Arabidopsis* utilizando herbicida Liberty de aproximadamente 0,11 % (consultar **tabela 15**).

Subsequentemente transplantaram-se as plantas T₁ seleccionadas anteriormente para vasos individuais e pulverizaram-se com várias taxas de herbicidas ariloxialcanoato comerciais. A **tabela 16** (no exemplo 6.5 anteriormente) compara a resposta dos genes AAD-1 (v2), AAD-1 (v3), AAD-2 (v1) e AAD-1 (v2) para conferir resistência a 2,4-D a produtos de transformação T₁ de *Arabidopsis*. Todos os genes proporcionaram de facto alguma resistência significativa a 2,4-D relativamente a linhas de controlo transformadas e não transformadas; contudo, as construções individuais foram muito variáveis relativamente à sua capacidade de conferir resistência a 2,4-D para plantas T₁ de *Arabidopsis* individuais. Dentro de determinado tratamento, o nível de

resposta da planta variou grandemente e pode ser atribuído ao facto de cada planta representar um evento de transformação independente. É importante salientar que para cada taxa de 2,4-D ensaiada houve indivíduos que não foram afectados enquanto alguns foram gravemente afectados. Apresenta-se na **tabela 16** uma taxa média de lesão para a população global apenas para demonstrar a diferença significativa entre as plantas transformadas com AAD-1 (v2), AAD-1 (v3), AAD-2 (v1) ou AAD-2 (v2) contra o tipo selvagem ou controlos transformados com PAT/Cry1F.

Surpreendentemente, os produtos de transformação AAD-2 (v1) foram muito menos resistentes a 2,4-D do que os dos genes AAD-1 (v2) ou AAD-1 (v3) (**tabela 16**) tanto relativamente a frequência de plantas altamente tolerantes como a lesão média global. Nenhuma plantas transformada com AAD-2 (v1) sobreviveu a 2,4-D a 200 g ae/ha relativamente sem lesões (<20% de lesões visíveis) e a lesão para a população global foi de cerca de 83%. Contrariamente, 56% (45 de 80) de plantas T₁ transformadas com AAD-1 (v2) sobreviveram a 2,4-D a 200 g ae/ha sem lesões (média de lesão da população = 34%) e >73% (11 de 15) de plantas T₁ AAD-1 (v3) não mostraram lesões (média de lesão da população = 14%). Consultar a **figura 20**. A tolerância melhorou ligeiramente para AAD2 (v2) otimizado para planta relativamente ao gene nativo; contudo, a comparação de ambos os genes AAD-1 e AAD-2 otimizados para planta indica uma vantagem significativa para AAD-1 (v3) na planta (consultar **tabela 16**).

Estes resultados são inesperados já que a comparação *in vitro* de AAD-1 (v2) e AAD-2 (v1) nativos indicou que 2,4-D era melhor degradado por AAD-2 (v1). AAD-2 (v1) é expresso em plantas T₁ individuais a diferentes níveis com o tamanho esperado; contudo, esta proteína expressa proporcionou pouca protecção contra lesão por 2,4-D. Existe pouca correlação entre o nível de expressão verificado na hibridação "Western" e o nível de lesão de 2,4-D nas mesmas plantas. Consultar a **figura 21**. Não foi evidente uma grande diferença no nível de expressão de proteína (na planta) para genes AAD-2 nativos e

genes otimizados para planta. Estes dados corroboram revelações anteriores que tornam inesperada a expressão de AAD-1 (v3) na planta para proporcionar resistência a 2,4-D e herbicidas AOPP.

Exemplo 18 - Aplicações de extermínio pré-plantio

Este exemplo e os seguintes são exemplos específicos de novas utilizações de herbicida tornadas possíveis pelo AAD-1 objecto do invento.

As aplicações de extermínio pré-plantio pretendem eliminar ervas daninhas que apareceram durante o Inverno ou no início da Primavera antes do plantio de determinada colheita. Tipicamente aplicam-se estas aplicações em sistemas de gestão sem lavoura ou com lavoura reduzida em que a remoção física de ervas daninhas não fica completa antes do plantio. O programa de herbicida deve por isso controlar uma muito vasta variedade de ervas daninhas de folha larga e gramíneas presentes na altura do plantio. O glifosato, o gramoxone e o glufosinato são exemplos de herbicidas não selectivos, não residuais vastamente utilizados para aplicações de herbicida para extermínio pré-plantio. Contudo, algumas ervas daninhas são difíceis de controlar nesta altura da estação devido a um ou mais dos seguintes: insensibilidade inerente da espécie de erva daninha ou biótipo ao herbicida, tamanho relativamente grande das ervas daninhas anuais de Inverno e condições climáticas frias que limitam a absorção e actividade do herbicida. Estão disponíveis várias opções de herbicida para mistura em tanque com estes herbicidas para aumentar o espectro e actividade nas ervas daninhas nos casos em que os herbicidas não selectivos são fracos. Um exemplo seria aplicações em misturas em tanque de 2,4-D com glifosato para auxiliar no controlo de *Conyza canadensis* (avoadinha). Pode utilizar-se glifosato desde 420 a 1680 g ae/ha, mais tipicamente 560 a 840 g ae/ha, para o controlo de extermínio pré-plantio da maioria das ervas daninhas presentes; contudo, pode aplicar-se 2,4-D a 280 - 1120 g ae/ha para ajudar no controlo de muitas espécies de erva daninha de folha larga

(e.g., avoadinha). O 2,4-D é um herbicida de eleição porque é eficaz numa muito vasta gama de ervas daninhas de folha larga, eficaz mesmo a baixas temperaturas e extremamente económico. Contudo, se a colheita subsequente é uma cultura de dicotiledóneas sensíveis, os resíduos de 2,4-D no solo (apesar da sua curta duração) podem ter um impacto negativo na colheita. A soja é uma cultura sensível e necessita de um período de tempo mínimo de 7 dias (para uma taxa de 2,4-D a 280 g ae/ha) até pelo menos 30 dias (para aplicações de 2,4-D de 1120 g ae/ha) entre as aplicações de extermínio e o plantio. O 2,4-D está proibido como tratamento de extermínio antes da plantação de algodão (consultar os critérios federais, estando a maioria disponíveis através de CPR, 2003 ou na internet em cdms.net/manuf/manuf.asp). Com algodão ou soja transformados com AAD-1 (v3) estas culturas devem ser capazes de sobreviver a resíduos de 2,4-D no solo de aplicações de extermínio aplicadas directamente e mesmo após a plantação, antes da emergência da colheita. A flexibilidade aumentada e o custo reduzido dos parceiros de mistura em tanque (ou pré-mistura comercial) melhorarão o controlo das opções de ervas daninhas e aumentará a robustez das aplicações de extermínio em situações importantes sem lavoura e com lavoura reduzida. Este exemplo é uma de muitas opções que estarão disponíveis. Os peritos na especialidade de controlo de ervas daninhas notarão várias outras aplicações incluindo, entre outras gramoxone + 2,4-D ou glufosinato + 2,4-D por utilização de produtos descritos nos critérios federais de herbicidas (CPR, 2003) e utilizações descritas no Agriliance Crop Protection Guide (2003), como exemplos. Os peritos na especialidade reconhecerão também que o exemplo anterior pode ser aplicado a qualquer colheita sensível a 2,4-D (ou outro herbicida fenoxiauxínico) que seria protegida pelo gene AAD-1 (v3) se for transformada de forma estável.

Exemplo 19 - Utilização na colheita de herbicidas fenoxiauxínicos em soja, algodão e outras culturas de dicotiledóneas transformadas apenas com AAD-1 (v3)

O gene *AAD-1 (v3)* pode permitir a utilização de herbicidas fenoxiauxínicos (e.g., 2,4-D, diclorprop, MCPA, et al.) para o controlo de um vasto espectro de ervas daninhas de folha larga directamente em culturas normalmente sensíveis a 2,4-D. A aplicação de 2,4-D de 280 a 2240 g ae/ha controlaria a maioria das espécies de ervas daninhas de folha larga presentes em ambientes agronómicos. Mais tipicamente utiliza-se 560 - 1120 g ae/ha. Para um controlo completo do sistema de ervas daninhas, devem controlar-se as ervas daninhas gramíneas. Vários herbicidas graminicidas de largo espectro, incluindo entre outros haloxifop, quizalofop, fenoxaprop, fluazifop, setoxidim e cletodim estão actualmente registados para utilização na maioria das culturas de dicotiledóneas que são naturalmente tolerantes a estes herbicidas. Uma combinação de quizalofop (20 - 100 g ae/ha) mais 2,4-D (420 - 840 g ae/ha) poderia proporcionar dois modos de acção de herbicida numa cultura de dicotiledóneas transformadas com *AAD-1 (v3)* (i.e., soja ou algodão) que controlaria a maioria das ervas daninhas agronómicas de modo semelhante ao glifosato em culturas tolerantes ao glifosato (consultar o espectro de controlo de ervas daninhas por referência às classificações de desempenho do Agrilience Crop Protection Guide).

Uma vantagem desta ferramenta adicional é o custo extremamente reduzido da componente de herbicida de folha larga e dos potenciais resíduos de curta duração do controlo de ervas daninhas proporcionados por taxas elevadas de 2,4-D e/ou herbicidas AOPP quando utilizados em taxas mais elevadas, enquanto herbicida não residual como glifosato não proporcionaria qualquer controlo de ervas daninhas de germinação tardia. Esta ferramenta também proporciona um mecanismo de rotação dos modos de acção dos herbicidas com a conveniência de HTC como uma estratégia integrada de resistência a herbicida e gestão de variação de erva daninha numa estratégia de colheita tolerante a glifosato/rotação de HTC com *AAD-1 (v3)*, quer se faça ou não rotação das espécies de cultura. Adicionalmente, as componentes deste sistema de controlo de ervas daninhas gramíneas e de folha larga são independentes entre si, permitindo assim que o perito na

especialidade de controlo de ervas daninhas determine a razão de herbicida auxínico e AOPP mais eficaz do ponto de vista de preço e de eficácia. Por exemplo, caso as ervas daninhas de folha larga sejam as únicas ervas daninhas significativamente presentes quando se necessita aplicação de herbicida, poderia efectuar-se uma aplicação de herbicida 2,4-D de 560 a 1120 g ae/ha sem outro herbicida. Tal reduziria as aplicações desnecessárias de herbicida, proporcionaria flexibilidade para reduzir custos à cabeça e reduziria as cargas ambientais de pesticidas e reduziria a pressão selectiva desnecessária para o desenvolvimento de ervas daninhas resistentes a herbicida.

Os benefícios adicionais poderiam incluir tolerância a desvio ou volatilização por 2,4-D como mecanismos para lesão por 2,4-D fora do campo para culturas de dicotiledóneas; ausência de necessidade de intervalo antes da plantação após aplicação de 2,4-D (consultar exemplo anterior); e menos problemas provenientes de lesão por contaminação de culturas de dicotiledóneas resultantes de tanques de mistura que continham 2,4-D com limpeza incompleta. Podem ainda utilizar-se dicamba (e outros herbicidas) para o controlo subsequente de colheitas voluntárias de dicotiledóneas transformadas com AAD-1 (v3).

Os peritos na especialidade reconhecerão também que o exemplo anterior pode ser aplicado a qualquer cultura sensível a 2,4-D (ou outro herbicida fenoxiauxínico) que seria protegida pelo gene AAD-1 (v3) caso fosse transformada de forma estável. O perito na especialidade de controlo de ervas daninhas reconhecerá agora que a utilização de vários herbicidas fenoxiauxínicos comerciais sozinhos ou em combinação com qualquer herbicida AOPP comercial é permitida pela transformação com AAD-1 (v3). Podem determinar-se taxas específicas de outros herbicidas representativos destes grupos químicos pelas características do herbicida compiladas no livro CPR (Crop Protection Reference) ou compilação semelhante ou qualquer referência de protecção de colheitas comercial ou académica tais como o Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Considera-se que cada herbicida alternativo com

permissão de utilização em HTC através de AAD-1 (v3) quer utilizado sozinho, em mistura de tanque ou sequencialmente, encontra-se no âmbito deste invento.

Exemplo 20 - Utilização na colheita de herbicidas fenoxiauxínicos e AOPP em milho, arroz e outras espécies de monocotiledóneas transformadas apenas com AAD-1 (v3)

De forma análoga, a transformação de espécies gramíneas (tais como, entre outras, milho, arroz, trigo, cevada ou relva e pasto) com AAD-1 (v3) permitiria a utilização de graminicidas AOPP altamente eficazes em culturas normalmente sensíveis a esses herbicidas. A maioria das espécies gramíneas tem uma tolerância natural a herbicidas auxínicos tais como as fenoxiauxinas (i.e., 2,4-D, diclorprop, et al.). Contudo, um nível relativamente reduzido de selectividade de cultura resultou na diminuição da utilidade dessas culturas devido ao encurtamento da janela temporal de aplicação e ervas daninhas de folha larga alternativas. As culturas de monocotiledóneas transformadas com AAD-1 (v3) permitiriam assim a utilização de uma combinação semelhante de tratamentos descritos para culturas de dicotiledóneas tais como a aplicação de 2,4-D de 280 a 2240 g ae/ha para controlar a maioria das espécies de erva daninha de folha larga. Mais tipicamente utilizar-se-ia 560 - 1120 g ae/ha. Poderia utilizar-se uma variedade de herbicidas graminicida AOPP de largo espectro (incluindo entre outros haloxifop, quizalofop, fenoxaprop e fluazifop) para controlar eficazmente uma vasta selecção de ervas daninhas gramíneas. Não se poderia utilizar neste sistema herbicidas graminicidas de ciclo-hexanodiona tal como setoxidim, cletodim, et al. tal como mostrado para culturas de dicotiledóneas dado que AAD-1 não protegeria destes grupos químicos e as culturas gramíneas seriam naturalmente sensíveis aos grupos químicos de ciclo-hexanodiona. Contudo, este atributo permitiria a utilização de herbicidas ciclo-hexanodiona para o controlo subsequente de colheitas voluntárias de gramíneas transformadas com AAD-1 (v3). Estratégias semelhantes para controlo de ervas daninhas são agora permitidas por AAD-1 para as espécies de culturas de

dicotiledóneas. Uma combinação de quizalofop (20 - 100 g ae/ha) mais 2,4-D (420 - 840 g ae/ha) poderia proporcionar dois modos de acção de herbicidas numa cultura de monocotiledóneas transformada com *AAD-1 (v3)* (e.g., milho e arroz) que controlaria a maioria das ervas daninhas agronómicas de modo semelhante a glifosato em culturas tolerantes a glifosato (consultar o espectro de controlo de ervas daninhas por referência às classificações de desempenho do Agriliance Crop Protection Guide).

Uma vantagem desta ferramenta adicional é o custo extremamente reduzido da componente de herbicida de folha larga e dos potenciais resíduos de curta duração do controlo de ervas daninhas proporcionados por taxas elevadas de 2,4-D e/ou herbicidas AOPP quando utilizados a taxas mais elevadas. Contrariamente, um herbicida não residual como glifosato não proporcionaria qualquer controlo de ervas daninhas de germinação tardia. Esta ferramenta também proporciona um mecanismo de fazer rotação dos modos de acção dos herbicidas com a conveniência de HTC como uma estratégia integrada de resistência a herbicida e gestão de variação de erva daninha numa estratégia de colheita tolerante a glifosato/rotação de HTC com *AAD-1 (v3)*, quer se alterne ou não as espécies de cultura. Adicionalmente, as componentes deste sistema de controlo de ervas daninhas gramíneas e de folha larga são independentes entre si, permitindo assim que o perito na especialidade de controlo de ervas daninhas determine a razão de herbicida auxínico e AOPP mais eficaz do ponto de vista de preço e de eficácia. Por exemplo, caso as ervas daninhas de folha larga sejam as únicas ervas daninhas significativamente presentes quando se necessita aplicação de herbicida, poderia efectuar-se uma aplicação de herbicida 2,4-D de 560 a 1120 g ae/ha sem outro herbicida. Tal reduziria as aplicações desnecessárias de herbicida, proporcionaria flexibilidade para reduzir custos à cabeça e reduziria as cargas ambientais de pesticidas e reduziria a pressão selectiva desnecessária para o desenvolvimento de ervas daninhas resistentes a herbicida. A tolerância acrescida de milho e outras monocotiledóneas às fenoxiauxinas permitirá a utilização destes herbicidas na

cultura sem restrições de estágios de crescimento ou o potencial para inclinação da cultura, fenómenos de desenrolamento tais como "rabos de rato", inclinação da cultura, caule quebradiço induzido por reguladores de crescimentos em milho ou raízes adventícias deformadas.

Os peritos na especialidade reconhecerão também que o exemplo anterior pode ser aplicado a qualquer cultura de monocotiledóneas que seria protegida pelo gene *AAD-1 (v3)* contra lesão por qualquer herbicida AOPP. O perito na especialidade de controlo de ervas daninhas reconhecerá agora que a utilização de vários herbicidas fenoxiauxínicos sozinhos ou em combinação com qualquer herbicida AOPP comercial é permitida pela transformação *AAD-1 (v3)*. Podem determinar-se taxas específicas de outros herbicidas representativos destes grupos químicos pelas características do herbicida compiladas no livro CPR (Crop Protection Reference) ou compilação semelhante, compilações de critérios na internet (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), ou qualquer referência de protecção de colheitas comercial ou académica tais como o Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Considera-se que cada herbicida alternativo com permissão de utilização em HTC através de *AAD-1 (v3)* quer utilizado sozinho, em mistura em tanque ou sequencialmente, encontra-se no âmbito deste invento.

Exemplo 21 - *AAD-1 (v3)* juntamente com a característica de tolerância a glifosato em qualquer cultura

A grande maioria das áreas plantadas com algodão, colza e soja na América do Norte apresentam uma característica de tolerância a glifosato (GT) e a adopção de milho GT está a aumentar. Têm estado em desenvolvimento culturas GT adicionais (e.g., trigo, arroz, beterraba açucareira e relva) mas até à data ainda não foram lançadas no mercado. Muitas outras espécies resistentes a glifosato estão num estágio entre experimental e de desenvolvimento (e.g., alfalfa, cana-de-açúcar, girassol, beterrabas, ervilhas, cenouras, pepinos, alface, cebola, morango, tomate e tabaco; espécies de

silvicultura tais como choupo e liquidâmbar; e espécies hortícolas tais como margaridas, petúnia e begónias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 na internet). Os GTC são ferramentas valiosas pela impressionante variedade de ervas daninhas controladas e conveniência e eficácia económica proporcionada por este sistema. Contudo, a utilidade do glifosato como um tratamento de base que é actualmente padrão é seleccionar para ervas daninhas resistentes a glifosato. Além disso, as ervas daninhas contras as quais o glifosato é inerentemente menos eficaz estão a variar para espécie predominante em campos nos quais se estão a praticar programas químicos apenas com glifosato. Agregando AAD-1 (v3) com uma característica GT, quer através de criação convencional ou conjuntamente como um novo evento de transformação, poderia melhorar a eficácia de controlo de ervas daninhas, flexibilidade e capacidade de gerir variações de ervas daninhas e desenvolvimento de resistência a herbicida. Tal como mencionado nos exemplos anteriores, por transformação de culturas com AAD-1 (v3), pode aplicar-se selectivamente herbicidas AOPP em culturas de monocotiledóneas, as culturas de monocotiledóneas terão uma maior margem de segurança relativamente a fenoxiauxina e podem aplicar-se selectivamente as fenoxiauxinas em culturas de dicotiledóneas. Podem prever-se vários cenários para opções de controlo melhorado de ervas daninhas em que se juntam AAD-1 (v3) e uma característica GT em quaisquer espécies de culturas de monocotiledóneas ou de dicotiledóneas:

a) Pode aplicar-se glifosato a uma taxa de aplicação padrão pós-emergência (420 a 2160 g ae/ha, de preferência 560 a 840 g ae/ha) para o controlo da maioria das espécies de ervas daninhas gramíneas e de folha larga. Para o controlo de ervas daninhas de folha larga resistentes a glifosato tal como *Conyza canadensis* ou ervas daninhas inerentemente difíceis de controlar com glifosato (e.g., *Commelina* spp), pode aplicar-se 2,4-D a 280-2240 g ae/ha (de preferência 560-1120 g ae/ha) sequencialmente, em mistura em tanque ou como uma pré-mistura com glifosato para proporcionar controlo eficaz.

b) Pode aplicar-se glifosato a uma taxa de aplicação padrão pós-emergência (420 a 2160 g ae/ha, de preferência 560 a 840 g ae/ha) para o controlo da maioria das espécies de ervas daninhas gramíneas e de folha larga. Para o controlo de espécies de gramíneas resistentes a glifosato tal como *Lolium rigidum* ou *Eleusine indica*, pode aplicar-se quizalofop a 10-200 g ae/ha (de preferência 20-100 g ae/ha) sequencialmente, em mistura em tanque ou como uma pré-mistura com glifosato para proporcionar controlo eficaz.

c) Presentemente, as taxas de glifosato aplicadas em GTC variam geralmente na gama entre 560 e 2240 g ae/ha por ponto temporal de aplicação. O glifosato é muito mais eficaz em espécies gramíneas do que em espécies de erva daninha de folha larga. As características AAD-1 (v3) + GT acumuladas permitiriam taxas de glifosato eficazes para gramíneas de (105-840 g ae/ha, com maior preferência 210-420 g ae/ha). Poderia então aplicar-se 2,4-D (a 280-2240 g ae/ha, com maior preferência 560-1120 g ae/ha) sequencialmente, em mistura em tanque ou como uma pré-mistura com taxas de glifosato eficazes para gramíneas para proporcionar o controlo necessário de ervas daninhas de folha larga. Poderia utilizar-se um herbicida AOPP tal como quizalofop a 10-200 g ae/ha (de preferência 20-100 g ae/ha e com maior preferência 20-35 g ae/ha) para um controlo mais robusto de ervas daninhas gramíneas e/ou para atrasar o desenvolvimento de gramíneas resistentes a glifosato. A taxa reduzida de glifosato proporcionaria também algum benefício ao controlo de ervas daninhas de folha larga; contudo, o controlo primário seria proporcionado por 2,4-D.

O perito na especialidade de controlo de ervas daninhas reconhecerá que a utilização de um ou mais herbicidas fenoxiauxínicos comerciais sozinhos ou em combinação (sequencial ou independentemente) com um ou mais herbicidas AOPP comerciais é permitida pela transformação das culturas com AAD-1 (v3). Podem determinar-se taxas específicas de outros herbicidas representativos destes grupos químicos pelas características do herbicida compiladas no livro CPR (Crop

Protection Reference) ou compilação semelhante, critérios compilados na internet (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp) ou quaisquer guias de protecção de colheitas comerciais ou académicos tais como o Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo com permissão de utilização em HTC através de AAD-1 (v3) quer utilizado sozinho, em mistura de tanque ou sequencialmente, encontra-se no âmbito deste invento.

Exemplo 22 - AAD-1 (v3) juntamente com a característica de tolerância a glufosinato em qualquer cultura

A tolerância ao glufosinato (*PAT* ou *bar*) está actualmente presente em várias culturas plantadas na América do Norte como marcador seleccionável para uma característica de entrada tal como proteínas de resistência a insectos ou especificamente como uma característica de HTC. As culturas incluem, entre outras, colza, milho e algodão tolerantes a glufosinato. Têm estado em desenvolvimento culturas tolerantes a glufosinato adicionais (e.g., arroz, beterraba açucareira, soja e relva) mas ainda não foram introduzidas no mercado até à data. O glufosinato, tal como o glifosato, é um herbicida de largo espectro para gramíneas e folhas largas relativamente não selectivo. O modo de acção do glufosinato difere do glifosato. É de actuação mais rápida resultando na secura e "queima" das folhas tratadas 24-48 horas após a aplicação do herbicida. Tal é vantajoso para o aparecimento de controlo rápido de ervas daninhas. Contudo, tal também limita a translocação de glufosinato para regiões meristemáticas de plantas alvo resultando num pior controlo de ervas daninhas tal como evidenciado pelas taxas de desempenho relativas do controlo de ervas daninhas pelos dois compostos em muitas espécies (Agriliance, 2003).

Acumulando AAD-1 (v3) com uma característica de tolerância a glufosinato, quer através de criação convencional ou conjuntamente como um novo evento de transformação, poderia melhorar a eficácia de controlo de ervas daninhas, flexibilidade e capacidade de gerir variações de ervas

daninhas e desenvolvimento de resistência a herbicida. Tal como mencionado nos exemplos anteriores, por transformação de culturas com AAD-1 (v3) podem aplicar-se selectivamente herbicidas AOPP em culturas de monocotiledóneas, as culturas de monocotiledóneas terão uma maior margem de segurança relativamente a fenoxiauxina e podem aplicar-se selectivamente as fenoxiauxinas em culturas de dicotiledóneas. Podem prever-se vários cenários para opções de controlo melhorado de ervas daninhas em que se juntam AAD-1 (v3) e uma característica de tolerância a glufosinato em quaisquer espécies de culturas de monocotiledóneas ou de dicotiledóneas:

a) Pode aplicar-se glufosinato a uma taxa de aplicação padrão pós-emergência (200 to 1700 g ae/ha, de preferência 350 a 500 g ae/ha) para o controlo de muitas espécies de ervas daninhas gramíneas e de folha larga. Até à data, não foram confirmadas quaisquer ervas daninhas resistentes a glufosinato; contudo, o número de ervas daninhas inerentemente tolerantes a glufosinato é maior do que a glifosato.

i) Puderam controlar-se espécies de ervas daninhas gramíneas inerentemente tolerantes (e.g., *Echinochloa* spp ou *Sorghum* spp) por mistura em tanque de quizalofop a 10-200 g ae/ha (de preferência 20-100 g ae/ha).

ii) Puderam controlar-se espécies de ervas daninhas de folha larga inerentemente tolerantes (e.g., *Cirsium arvensis* e *Apocynum cannabinum*) por mistura em tanque de 2,4-D a 280-2240 g ae/ha, com maior preferência 560-2240 g ae/ha, para controlo eficaz destas espécies perenes mais difíceis de controlar e para melhorar a robustez do controlo das espécies anuais de ervas daninhas de folha larga.

b) Uma combinação em três frentes de glufosinato (200-500 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), por exemplo, poderia proporcionar um espectro mais robusto e sobreponível de controlo de ervas daninhas. Adicionalmente, o espectro sobreponível proporciona um

mecanismo adicional para a gestão ou atraso de ervas daninhas resistentes a herbicida.

O perito na especialidade de controlo de ervas daninhas reconhecerá que a utilização de um ou mais herbicidas fenoxiauxínicos comerciais sozinhos ou em combinação (sequencial ou independentemente) com um ou mais herbicidas AOPP comerciais é permitida pela transformação das culturas com AAD-1 (v3). Podem determinar-se taxas específicas de outros herbicidas representativos destes grupos químicos pelos critérios do herbicida compiladas no livro CPR (Crop Protection Reference) ou compilação semelhante, critérios compilados na internet (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp) ou quaisquer guias de protecção de colheitas comerciais ou académicos tais como o Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo com permissão de utilização em HTC através de AAD-1 (v3) quer utilizado sozinho, em mistura em tanque ou sequencialmente, encontra-se no âmbito deste invento.

Exemplo 23 - AAD-1 (v3) juntamente com a característica AHAS em qualquer cultura

A tolerância a herbicida imidazolinona (AHAS, *et al.*) está actualmente presente em várias culturas plantadas na América do Norte incluindo, entre outras, milho, arroz e trigo. Têm estado em desenvolvimento culturas tolerantes a imidazolinona adicionais (e.g., algodão e beterraba açucareira) mas ainda não foram introduzidas no mercado até à data. Muitos herbicidas imidazolinona (e.g., imazamox, imazetapir, imazaquin e imazapic) são presentemente utilizados selectivamente em várias culturas convencionais. A utilização de imazetapir, imazamox e do imazapir não selectivo foi permitida através de características de tolerância a imidazolinona tal como AHAS *et al.* Até à data, as HTC tolerantes a imidazolinona têm a vantagem de não serem transgénicas. Esta classe química também tem actividade residual no solo significativa sendo assim capaz de proporcionar controlo de ervas daninhas prolongado para além

do ponto temporal da aplicação, contrariamente a sistemas baseados em glifosato ou glufosinato. Contudo, o espectro de ervas daninhas controladas pelos herbicidas imidazolinona não é tão vasto como para o glifosato (Agrilience, 2003). Adicionalmente, os herbicidas imidazolinona têm um modo de acção (inibição de acetolactato-sintetase, ALS) contra o qual muitas ervas daninhas desenvolveram resistência (Heap, 2004). Por junção de *AAD-1 (v3)* com uma característica de tolerância a imidazolinona, quer através de criação convencional ou conjuntamente como um novo evento de transformação, poderia melhorar eficácia de controlo de ervas daninhas, flexibilidade e capacidade de gerir variações de ervas daninhas e desenvolvimento de resistência a herbicida. Tal como mencionado nos exemplos anteriores, por transformação de culturas com *AAD-1 (v3)* podem aplicar-se selectivamente herbicidas AOPP em culturas de monocotiledóneas, as culturas de monocotiledóneas terão uma maior margem de segurança relativamente a fenoxiauxinas e podem aplicar-se selectivamente as fenoxiauxinas em culturas de dicotiledóneas. Podem prever-se vários cenários para opções de controlo melhorado de ervas daninhas em que se juntam *AAD-1 (v3)* e uma característica de tolerância a imidazolinona em quaisquer espécies de culturas de monocotiledóneas ou de dicotiledóneas:

a) Pode aplicar-se imazetapir a uma taxa de aplicação padrão pós-emergência de (35 a 280 g ae/ha, de preferência 70 a 140 g ae/ha) para o controlo de muitas espécies de gramíneas e de folha larga.

i) Puderam controlar-se espécies de ervas daninhas de folha larga resistentes a inibidor de ALS tais como *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre outras, Heap, 2004) por mistura em tanque de 2,4-D a 280-2240 g ae/ha, com maior preferência 560-1120 g ae/ha, .

ii) Puderam também controlar-se espécies de ervas daninhas de folha larga inerentemente mais tolerantes a herbicidas imidazolinona tais como *Ipomoea* spp. por

mistura em tanque de 2,4-D a 280-2240 g ae/ha, com maior preferência 560-1120 g ae/ha.

iii) Puderam controlar-se espécies de ervas daninhas gramíneas resistentes a inibidor de ALS tais como *Sorghum halepense* e *Lolium* spp. por mistura em tanque de quizalofop a 10-200 g ae/ha (de preferência 20-100 g ae/ha).

iv) Puderam também controlar-se espécies de ervas daninhas gramíneas inerentemente tolerantes (e.g., *Agropyron repens*) por mistura em tanque de quizalofop a 10-200 g ae/ha (de preferência 20-100 g ae/ha).

b) Uma combinação em três frentes de imazetapir (35-280 g ae/ha, de preferência 760-140 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), por exemplo, poderia proporcionar um espectro mais robusto e sobreponível de controlo de ervas daninhas. Adicionalmente, o espectro sobreponível proporciona um mecanismo adicional para a gestão ou atraso de ervas daninhas resistentes a herbicida.

O perito na especialidade de controlo de ervas daninhas reconhecerá que a utilização de quaisquer de entre vários herbicidas imidazolinona, herbicidas fenoxiauxínicos ou herbicidas AOPP comerciais sozinhos ou em combinação múltiplas, é permitida pela transformação com *AAD-1 (v3)* e junção com qualquer característica de tolerância a imidazolinona por criação convencional ou por engenharia genética. Podem determinar-se taxas específicas de outros herbicidas representativos destes grupos químicos pelas características do herbicida compiladas no livro CPR (Crop Protection Reference) ou compilação semelhante, características compiladas na internet (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp) ou quaisquer guias de protecção de colheitas comerciais ou académicos tais como o Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo com permissão de utilização em HTC através de *AAD-1 (v3)* quer utilizado sozinho, em mistura em tanque ou sequencialmente, encontra-se no âmbito deste invento.

Exemplo 24 - AAD-1 (v3) em arroz

24.1 - Descrição dos meios.

Os meios de cultura utilizados foram ajustados a pH 5,8 com KOH 1 M e solidificados com Phytigel a 2,5 g/l (Sigma). Cultivaram-se calos embriogénicos em placas de Petri 100 x 20 mm contendo 40 ml de meio semi-sólido. Cresceram-se plântulas de arroz em 50 ml de meio em caixas Magenta. Mantiveram-se as suspensões de células em matrizes de 125 ml contendo 35 ml de meio líquido e agitaram-se por rotação a 125 rpm. A indução e manutenção de culturas embriogénicas ocorreu no escuro a 25-26°C e a regeneração de plantas e cultura das plantas completas ocorreu num fotoperíodo de 16 h (Zhang *et al.* 1996).

A indução e manutenção de calos embriogénicos ocorreu em meio basal NB tal como descrito anteriormente (Li *et al.* 1993), mas adaptado para conter glutamina a 500 mg/l. Iniciaram-se culturas em suspensão e mantiveram-se em meio líquido SZ (Zhang *et al.* 1998) com a inclusão de sacarose a 30 g/l em vez de maltose. O meio osmótico (NB0) consistiu de meio NB com a adição de manitol e sorbitol cada um 0,256 M. Selecionaram-se calos resistentes a higromicina B em meio NB suplementado com higromicina B a 50 mg/l durante 3-4 semanas. A pré-regeneração ocorreu em meio (PRH50) consistindo de meio NB sem ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) mas com a adição de 6-benzilaminopurina (BAP) a 2 mg/l, ácido α -naftalenacético (NAA) a 1 mg/l, ácido abscísico (ABA) a 5 mg/l e higromicina B a 50 mg/l durante 1 semana. A regeneração de plântulas seguiu através de cultura em meio de regeneração (RNH50) compreendendo meio NB sem 2,4-D e suplementado com BAP a 3 mg/l, NAA a 0,5 mg/l e higromicina B a 50 mg/l até regeneração dos rebentos. Transferiram-se os rebentos para meio de enraizamento com sais basais de Murashige e Skoog a metade da concentração e vitaminas B5 de Gamborg, suplementado com sacarose a 1% e higromicina B a 50 mg/l (1/2MSH50).

24.2 - Desenvolvimento de culturas de tecidos.

Esterilizaram-se sementes maduras secas de *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 tal como descrito em Zhang et al. 1996. Induziram-se tecidos embriogénicos por cultura de sementes de arroz maduras estéreis em meio NB no escuro. Removeu-se o calo primário com aproximadamente 1 mm de diâmetro do escutelo e utilizou-se para iniciar suspensão celular em meio líquido SZ. Mantiveram-se então as suspensões tal como descrito em Zhang 1995. Removeram-se os tecidos embriogénicos derivados da suspensão da cultura líquida 3-5 dias após a subcultura anterior e colocaram-se em meio osmótico NBO para formar um círculo com cerca de 2,5 cm de diâmetro numa placa de Petri e cultivaram-se durante 4 h antes do bombardeamento. Dezasseis a 20 h após o bombardeamento transferiram-se os tecidos de meio NBO para meio de selecção NBH50 com higromicina B, assegurando que a superfície bombardeada estava virada para cima e incubou-se no escuro durante 14-17 dias. Separaram-se então os calos formados de novo dos explantes bombardeados originais e colocaram-se perto no mesmo meio. Após 8-12 dias adicionais, identificaram-se calos opacos relativamente compactos e transferiram-se para meio de pré-regeneração PRH50 durante 7 dias no escuro. O calo em crescimento, que se tornou mais compacto e opaco foi então sub-cultivado em meio de regeneração RNH50 durante um período de 14-21 dias com um fotoperíodo de 16 h. Transferiram-se os rebentos em regeneração para caixas Magenta contendo meio ½ de MSH50. Plantas múltiplas que regenerem a partir de um único explante consideraram-se irmãs e trataram-se como uma linha de planta independente. Pontuou-se uma planta como positiva para o gene hph se produzir raízes espessas e brancas e crescer vigorosamente em meio ½ de MSH50. Assim que as plântulas atingiram o topo das caixas Magenta, transferiram-se para solo num vaso de 6 cm com humidade a 100% durante uma semana e seguidamente deslocaram-se para uma câmara de crescimento com um fotoperíodo de 14 h a 30°C e no escuro a 21°C durante 2-3 semanas antes de transplantar para vasos de 13 cm na estufa. Recolheram-se as sementes e secaram-se a 37°C durante uma semana antes do armazenamento a 4°C.

24.3 - Bombardeamento com microprojecteis.

Todos bombardeamentos foram efectuados com o sistema Biolistic PDS-1000/He™ (BioRad, Laboratories, Inc.). Lavou-se uma vez três miligramas de partículas de ouro com 1,0 micrómetro de diâmetro com etanol a 100%, duas vezes com água destilada estéril e ressuspendeu-se em 50 µl de água num tubo Eppendorf siliconizado. Adicionou-se à suspensão de ouro cinco microgramas de ADN plasmídico representando uma razão molar 1:6 de pDOW3303 (vector contendo Hpt) para pDAB3403, 20 µl de espermidina (0,1 M) e 50 µl de cloreto de cálcio (2,5 M). Incubou-se a mistura à temperatura ambiente durante 10 min, sedimentou-se a 10000 rpm durante 10 s, ressuspendeu-se em 60 µl de etanol a 100% frio e distribuíram-se 8-9 µl para cada macro-transportador. Bombardearam-se amostras de tecido a 1100 psi e 27 polegadas de vácuo de Hg tal como descrito por Zhang *et al.* (1996).

24.4 - Ensaios de tolerância.

Pulverizaram-se plântulas de arroz no estágio de 3-5 folhas com solução de DuPont™ Assure® II a 0,3% (v/v) contendo concentrado de óleo de culturas Agridex a 1% (v/v) utilizando um pulverizador de ampola DeVilbiss (atomizador de vidro modelo 15-RD). Esta concentração corresponde a aproximadamente 140 g ae/ha. Pulverizou-se cada planta numa hote a uma distância de 8-12 polegadas com 6 jactos completos do pulverizador dirigidos de modo a cobrir a planta na sua totalidade com uma porção equivalente de herbicida. Cada jacto entregou aproximadamente 100 µl de solução à plântula. Após pulverização deixaram-se as plântulas secar durante uma hora antes de serem deslocadas para fora da hote. Determinou-se pontuação para sensibilidade ou resistência aos dias 10-14 após o tratamento (DAT) e apresenta-se na **tabela 35** seguidamente.

Tabela 35.	
Nome da amostra	Quizalofope a 140 g ae/ha
Controlo	Morta
63-1A	Sem lesão
63-1F	Sem lesão
63-4B	Sem lesão
63-4D	Sem lesão
63-6C	Morta

24.5 - Colheita de tecido, isolamento e quantificação de ADN.

Colocou-se tecido fresco em tubos e liofilizou-se a 4°C durante 2 dias. Após secagem completa do tecido colocou-se uma pérola de tungsténio (Valenite) no tubo e submetem-se as amostras a 1 minuto de moagem a seco utilizando um moinho de bolas Kelco. Seguiu-se então o procedimento padrão de isolamento de ADN DNeasy (Qiagen, Dneasy 69109). Corou-se então uma alíquota do ADN extraído com Pico Green (Molecular Probes P7589) e digitalizou-se num fluorómetro (BioTek) com padrões conhecidos para obter a concentração em ng/µl.

24.6 - Análise de transferência "Southern".

Efectuou-se análise de transferência "Southern" com ADN total obtido do kit Qiagen DNeasy. Submeteu-se um total de 2 µg de ADN a uma digestão durante a noite com HindIII para pDAB3403 para obter dados de integração. De igual modo, submeteu-se um total de 2 µg de ADN a uma digestão durante a noite com MfeI para obter os dados PTU. Após a digestão durante a noite correu-se uma alíquota de ~100 ng num gel a 1% para assegurar digestão completa. Após esta confirmação correram-se as amostras num gel de agarose grande a 0,85% durante a noite a 40 volt. Desnaturou-se então o gel em NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. Neutralizou-se então o gel em Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M pH 7,5 durante 30 minutos. Montou-se então um aparelho de gel contendo SSC 20x para obter uma transferência do gel por gravidade para membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante a noite. Após a transferência

durante a noite submeteu-se então a membrana a luz UV através de reticulador (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoule. Lavou-se então a membrana em SDS a 0,1%, SSC 0,1x durante 45 minutos. Após a lavagem de 45 minutos, incubou-se a membrana durante 3 horas a 80°C e seguidamente armazenou-se a 4°C até hibridação. Preparou-se o fragmento do molde de hibridação utilizando PCR de região de codificação utilizando o plasmídeo pDAB3404. Utilizou-se como molde um total de 100 ng de ADN total. Utilizou-se cada iniciador 20 mM com o kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Os iniciadores para o PCR de fragmento de "Southern" AAD-1 foram (Directo - ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:31) e (Inverso - GGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:32). Efectuou-se a reacção de PCR no termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), submetendo as amostras a 94°C durante 3 minutos e 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e 45 segundos seguidos de 72°C durante 10 minutos.

Correu-se o produto num gel de agarose a 1% e excisou-se e extraiu-se do gel utilizando o procedimento de extracção de gel Qiagen (28706). Submeteu-se então a membrana a uma etapa de pré-hibridação a 60°C durante 1 hora em tampão Perfect Hyb (Sigma H7033). Utilizou-se o procedimento da reacção de marcação com dCTP Prime it RmT (Stratagene 300392) para desenvolver a sonda baseada em p32 (Perkin Elmer). Limpou-se a sonda utilizando colunas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Utilizaram-se CPM com dois milhões de contagens para hibridar as transferências "Southern" durante a noite. Após a hibridação durante a noite, submeteram-se as transferências a duas lavagens de 20 minutos a 65°C em SDS a 0,1%, SSC 0,1x. Expuseram-se então as transferências num gerador de imagens de ³²P durante a noite e digitalizaram-se utilizando um digitalizador Storm (MOLECULAR DEVICES). Apresenta-se na **tabela 36** um resumo dos resultados.

Tabela 36. Resultados de "Southern".

Evento	Dados de "Southern" integrados	Dados de "Southern" PTU
	Número de bandas	Tamanho esperado de 3049 pb
63-1 A	8	sim, 7 bandas distintas
63-1 F	5	sim, 9 bandas distintas
63-4 A	20	sim, 20 bandas distintas
63-4 D	20	sim, 19 bandas distintas
63-6 C	2	Rendimento de ADN insuficiente em ambos os cortes

As plantas 63-1 A e 63-1 F não são o mesmo evento; As plantas 63-4 A e 63-4 D são o mesmo evento. Estes eventos têm os PTU do tamanho esperado mas são muito complexos. Estes dados PTU de transferência "Southern" correlacionam-se com os dados de expressão e com os dados de pulverização. A amostra 63-6 C não tinha ADN suficiente presente para efectuar tanto integração como transferências "Southern" PTU.

24.7 - Dados de "Western"

A preparação da amostra e as condições de análise foram tal como descrito anteriormente. Analisaram-se cinco linhas de arroz transgénico e um controlo não transgénico relativamente a expressão de AAD-1 utilizando ELISA e transferência "Western". Detectou-se AAD-1 em quatro linhas (63-1A, 63-1F, 63-4B e 63-4D) mas não na linha 63-1C ou na planta de controlo. Os níveis de expressão variaram entre 15,6 e 183 ppm de proteína solúvel total. Apresenta-se na **tabela 37** um resumo dos resultados.

Tabela 37.

Pista	Nome da amostra	TSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ELISA		"Western"
			[AAD1] (ng/mL)	Expressão (ppm)	
1	Controlo	6719,58	0,00	0,00	-
2	63-1A	8311,87	351,17	42,25	±
3	63-1F	11453,31	2092,35	182,69	++
4	63-4B	13835,09	216,00	15,61	+
5	36-4D	13656,49	717,05	52,51	++
6	63-6C	5343,63	0,00	0,00	-
7	Padrão AAD1 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)				+++
8	Padrão AAD1 (5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)				+++++

Exemplo 25 - Procedimentos de transformação de relva

Obteve-se transformação genética com *AAD-1* (v3) em substituição do gene "bar" tal como descrito seguidamente para *Agrostis palustris* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* através de calo embriogénico iniciado a partir das sementes (cv. Penn-A-4), tal como descrito na generalidade seguidamente. Consultar "Efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated turfgrass (*Agrostis stolonifera* L) transformation" (Luo et. al., 2004).

Infecta-se o calo com uma estirpe de *A. tumefaciens* (LBA4404) apresentando um vector super-binário que contém um gene bar de resistência a herbicida e dirigido por um promotor de ubiquitina de arroz. A eficiência global de transformação estável variou na gama de 18% a 45%. A transferência "Southern" e a análise genética confirmou a integração do transgene no genoma de *Agrostis palustris* e transmissão normal e expressão estável do transgene na geração T₁. Todos os eventos de transformação independentes apresentaram uma a três cópias do transgene e a maioria (60-65%) continha apenas uma cópia única do gene exógeno sem rearranjos aparentes.

25.1 - Preparação de sementes para indução de calo embriogénico.

Descascaram-se as sementes maduras com lixa e esterilizou-se a superfície com lixívia Clorox a 10% (v/v) (hipoclorito de sódio a 6%) com Tween 20 (polissorbato 20) a 0,2% (v/v) com agitação vigorosa durante 90 min. Após enxaguamento cinco vezes em água destilada e estéril, colocaram-se as sementes em meio de indução de calo (sais basais MS e vitaminas, sacarose a 30 g/l, caseína hidrolisada a 500 mg/l, ácido 3,6-dicloro-o-anísico (dicamba) a 6,6 mg/l, 6-benzilaminopurina (BAP) a 0,5 mg/l e Phytigel a 2 g/l. Ajustou-se o pH do meio a 5,7 antes de autoclavar a 120°C durante 20 min).

25.2 - Indução de calo embriogénico.

Mantiveram-se as placas de cultura contendo explantes de semente preparadas no escuro à temperatura ambiente durante 6 semanas. Seleccionaram-se visualmente calos embriogénicos e sub-cultivaram-se em meio de indução de calo fresco no escuro à temperatura ambiente durante 1 semana antes do co-cultivo.

25.3 - Infecção com *Agrobacterium* e co-cultivo.

Um dia antes da agro-infecção dividiu-se o calo embriogénico em bocados de 1 a 2 mm e colocaram-se em meio de indução de calo contendo acetossiringona 100 µM. Aplicou-se então uma alíquota de 10 µl de uma suspensão de *Agrobacterium* (LBA4404) (DO=1,0 a 660 nm) a cada bocado de calo seguido de 3 dias de co-cultivo no escuro a 25°C.

25.4 - Estágio de descanso e controlo de *Agrobacterium*.

Para a etapa de tratamento com antibiótico, transferiu-se então o calo e cultivou-se durante 2 semanas em meio de indução de calo mais cefotaxima a 125 mg/l e carbenicilina a 250 mg/l para suprimir o crescimento bacteriano.

25.5 - Selecção e identificação de potenciais colónias transgénicas.

Subsequentemente, para selecção, deslocou-se o calo para meio de indução de calo contendo cefotaxima a 250 mg/l e fosfinotricina (PPT) a 10 mg/l durante 8 semanas. Efectuou-se tratamento com antibiótico e efectuou-se o processo de selecção completo à temperatura ambiente no escuro. O intervalo de subcultura durante a selecção foi tipicamente de 3 semanas.

25.6 - Regeneração de plantas transgénicas.

Para regeneração de plantas, deslocam-se primeiro os eventos de calo em proliferação resistentes a PPT para meio de regeneração (meio basal MS, sacarose a 30 g/l, mio-inositol a 100 mg/l, BAP a 1 mg/l e Phytigel a 2 g/l) suplementado com

cefotaxima, PPT ou higromicina. Mantiveram-se estes calos no escuro à temperatura ambiente durante 1 semana e seguidamente deslocaram-se para a luz durante 2-3 semanas para desenvolvimento de rebentos. Não ocorreram plantas albinas com selecção por PPT (a utilização de higromicina como agente de selecção produz um nível elevado de plantas albinas).

25.7 - Indução de raízes e transferência para estufa.

Separaram-se então os rebentos pequenos e transferiram-se para meio de regeneração isento de hormona contendo PPT e cefotaxima para promover crescimento de raízes enquanto se mantém pressão selectiva e supressão de quaisquer células de *Agrobacterium* remanescentes. Transferiram-se então as plântulas com raízes bem desenvolvidas (3-5 semanas) para solo e cultivaram-se na estufa ou no campo.

25.8 - Vernalização e exogamia de plantas transgênicas.

Mantiveram-se as plantas transgênicas no exterior numa maternidade de confinamento (3-6 meses) até ao solstício de Inverno em Dezembro. Transferiram-se então as plantas vernalizadas para a estufa e mantiveram-se a 25°C com um fotoperíodo de 16/8 h e rodearam-se com plantas de tipo selvagem não transgênicas que fisicamente as isolaram de outras fontes de pólen. As plantas iniciaram florescência 3-4 semanas após terem sido deslocadas de volta para a estufa. Foram sujeitas a exogamia com o pólen das plantas de tipo selvagem que as rodeavam. Germinaram-se as sementes recolhidas de cada planta transgênica individual em solo a 25°C e cultivaram-se plantas T₁ na estufa para análise posterior.

25.9 - Outras gramíneas alvo.

Outras gramíneas que podem ser alvos para transformação AAD-1 de acordo com o presente invento incluem cabelo-de-cão-anual (*Poa annua*), grama forquilha, *Agrostis*, grama-bermuda, bluegrass, milho-zaburro, bromus, agrostide-ténue (*Agrostis capillaris*), Capim búfalo, alpista, grama São Carlos, grama centípede, *Festuca rubra commutata*, *Digitaria*, *Agrostis*

stolonifera, *Koeleria macrantha*, *Paspalum dilatatum*, festuca, *Festolium*, *Festuca ovina*, *Bouteloua gracilis*, grama índia (*Sorghastrum nutans*), sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), *Eragrostis*, misturas (equina, pasto, etc.), relvas nativas, *Dactyla*, azevém (*Lolium perenne*), *Agrostis gigantea*, cevadilha, azevém anual e perene, *Festuca rubra trichophylla*, poa-dos-prados (*Poa pratensis*), grama-santo-agostinho, *Festuca rubra rubra*, capim-sudão, *Panicum virgatum*, *Festuca arundinacea*, rabo-de-gato, *Deschampsia caespitosa*, relvas, erva de trigo e erva *Zoysia*.

Exemplo 26 - AAD-1 (v3) em colza

26.1 - Transformação de colza.

Utilizou-se o gene *AAD-1 (v3)* que confere resistência a 2,4-D para transformar *Brassica napus* var. Nexera* 710 com transformação mediada por *Agrobacterium*. A construção continha o gene *AAD-1 (v3)* dirigido pelo promotor CsVMV e o gene Pat dirigido pelo promotor AtUbi10.

Esterilizou-se a superfície das sementes com lixívia comercial a 10% durante 10 minutos e enxaguou-se 3 vezes com água destilada estéril. Colocaram-se então as sementes em meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962) a metade da concentração e manteve-se em regime de crescimento estabelecido a 25°C e um fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de escuro.

Excisaram-se segmentos de hipocótilo (3-5 mm) de plântulas com 5 - 7 dias e colocou-se em meio de indução de calo K1D1 (meio MS com quenetina a 1 mg/l e 2,4-D a 1 mg/l) durante 3 dias como pré-tratamento. Transferiram-se então os segmentos para uma placa de Petri tratada com *Agrobacterium* Z707S ou estirpe LBA4404 contendo pDAB721. Cultivou-se *Agrobacterium* durante a noite a 28°C no escuro num agitador a 150 rpm e subsequentemente ressuspendeu-se no meio de cultura.

Após 30 min de tratamento de segmentos de hipocótilo com *Agrobacterium*, colocaram-se estes de volta no meio de indução de calo durante 3 dias. Após co-cultivo colocaram-se os

segmentos em K1D1TC (meio de indução de calo contendo carbenicilina a 250 mg/l e timentina a 300 mg/l) durante uma semana de recuperação. Alternativamente colocam-se os segmentos directamente em meio de selecção K1D1H1 (meio anterior com Herbiace a 1 mg/l). A carbenicilina e a timentina foram os antibióticos utilizados para matar *Agrobacterium*. O agente de selecção Herbiace permitiu o crescimento das células transformadas.

Ensaaiaram-se por PCR amostras de calo de 35 eventos independentes. Todas as 35 amostras testaram positivo para a presença de *AAD-1 (v3)*, enquanto os controlos não transformados foram negativos (secção sobre o ensaio de PCR). Confirmaram-se que dez amostras de calo expressavam a proteína *AAD-1* tal como determinado por ELISA (secção sobre análise de proteína).

Colocaram-se então os segmentos de hipocótilo com calo em meio de regeneração de rebentos B3Z1H1 (meio MS, benzilamino purina a 3 mg/l, Zeatin a 1 mg/l, MES [ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico] a 0,5 g/l, nitrato de prata a 5 mg/l, Herbiace a 1 mg/l, carbenicilina e timentina). Após 3 semanas os rebentos iniciaram a regeneração. Transferem-se os segmentos de hipocótilo conjuntamente com os rebentos para meio B3Z1H3 (meio MS, benzilamino purina a 3 mg/l, Zeatin a 1 mg/l, MES [ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico] a 0,5 g/l, nitrato de prata a 5 mg/l, Herbiace a 3 mg/l, carbenicilina e timentina) durante mais 3 semanas.

Excisaram-se os rebentos dos segmentos de hipocótilo e transferiram-se para meio de alongamento de rebentos MESH10 (MS, MES a 0,5 g/l, Herbiace a 10 mg/l, carbenicilina, timentina) durante 2-4 semanas. Cultivam-se os rebentos alongados para indução de raízes em MSI.1 (MS com ácido indolebutírico a 0,1 mg/l). Assim que as plantas apresentaram um sistema de raízes bem estabelecido, estas foram transplantadas para o solo. Aclimataram-se as plantas em condições ambientais controladas no Convicon durante 1-2 semanas antes da transferência para a estufa.

Auto-polinizaram-se as plantas T0 transformadas na estufa para obter semente T1. Pulverizaram-se as plantas T0 e a descendência T1 com uma gama de concentrações de herbicida para estabelecer o nível de protecção pelo gene *AAD-1 (v3)*.

26.2 - "Análise molecular": materiais e métodos para colza

26.2.1 - Isolamento e quantificação de ADN de recolha de tecido.

Colocou-se tecido fresco nos tubos e liofilizou-se a 4°C durante 2 dias. Após secagem completa do tecido colocou-se uma pérola de tungsténio (Valenite) no tubo e submeteram-se as amostras a 1 minuto de moagem a seco utilizando um moinho de bolas Kelco. Seguiu-se então o procedimento padrão de isolamento de ADN DNeasy (Qiagen, Dneasy 69109). Corou-se então uma alíquota do ADN extraído com Pico Green (Molecular Probes P7589) e leu-se num fluorómetro (BioTek) com padrões conhecidos para obter a concentração em ng/ μ l.

26.2.2 - Reacção de polimerização em cadeia.

Utilizou-se um total de 100 ng de ADN total como molde. Utilizou-se cada iniciador a 20mM com o kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Os iniciadores para PCR de região de codificação de *AAD-1 (v3)* foram (Directo - ATGGCTCATG CTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:27) e (Inverso. - CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:28). Efectuou-se a reacção de PCR no termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), submetendo as amostras a 94°C durante 3 minutos e 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos e 72°C durante 2 minutos seguido de 72°C durante 10 minutos. Analisaram-se os produtos de PCR por electroforese num gel de agarose a 1% corado com EtBr. 35 amostras de 35 plantas com eventos *AAD-1 (v3)* tiveram teste positivo. Três amostras de controlo negativo tiveram teste negativo.

26.3 - ELISA.

Utilizando a ELISA estabelecida descrita na secção anterior, detectou-se proteína AAD-1 em 10 eventos de transformação de colza diferentes. Os níveis de expressão variaram entre 150 até mais de 1000 ppm de proteína solúvel total (TSP). Ensaaiaram-se três amostras diferentes de calos não transformados em paralelo com a detecção de sinal fraco, indicando que os anticorpos utilizados no ensaio tinham uma reactividade cruzada mínima com a matriz de células de colza. Apresenta-se na **tabela 38** um resumo dos resultados.

Tabela 38. Expressão de AAD1 em calos de colza.

N.º de amostra	Peso (mg)	[TSP] (µg/mL)	[AAD1] (ng/mL)	Expressão (ppm TSP)	PCR para AAD1
1	114	757,02	119,36	157,67	+
2	55	839,79	131,84	156,99	+
3	53	724,41	202,12	279,01	+
4	52	629,01	284,89	452,92	+
5	55	521,75	175,88	337,08	+
6	61	707,69	74,24	153,71	+
7	51	642,02	559,11	1026,73	+
8	65	707,69	270,73	382,56	+
9	51	642,02	197,90	308,25	+
10	51	1417,42	220,63	156,66	+
Controlo 1	53	2424,67	18,67	7,70	-
Controlo 2	61	2549,60	35,00	13,73	-
Controlo 3	59	2374,41	22,79	9,60	-

Referências

Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, e D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.

Agrilience Crop Protection Guide. 2003. Agrilience, LLC. St Paul, MN. 588 p.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers e D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z, Zhang, W. Miller e D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.

An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon, E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.

Armstrong C.L., C.E. Green, R.L. Phillips. 19.91. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop News Lett* 65:92-93.

Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas e F.C. Kafatos. 1983 *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [ed.] Academic Press, New York 100:266-285

Birch R.G. e T. Franks. 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-469.

CDMS. Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. 13 de Março de 2004. Disponível em net/manuf/manuf.asp.

Chee P.P., K.A. Foer, J.L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91:1212-1218.

Cheng M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner, and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115: 971-980.

Chu C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659-668.

Clemente T.E., B.J. LaVallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten, M.A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glifosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40: 797-803.

CPR: Crop Protection Reference. 2003 Chemical and Pharmaceutical Press, New York, NY. 2429 p.

Devine, M. D. 2005. Why are there not more herbicide-tolerant cultures? *Pest Manag. Sci.* 61:312-317.

Dietrich, Gabriele Elfriede (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. *Patente U.S.* 5 731 180.

Didierjean L, L. Gondet, R Perkins, S.M. Lau, H. Schaller, D.P. O'Keefe, D. Werck-Reichhart. 2002. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. *Plant Physiol* 2002, 130:179-189.

Ditta, G. S. Stranfield, D. Corbin e D.R Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium leliloti*. *PNAS* 77:7347-7351.

Edwards, R. A., L. H. Keller e D. M. Schifferli. 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* 207:149-157.

Falco S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward, P. Webber. 1995. Transgenic colza and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* 13:577-582.

Finer J. e M. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:175-182.

Fraley, R.T., D.G. Rogers e R. B. Horsch. 1986. Genetic transformation in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46.

Frame B.R., P.R. Drayton, S.V. Bagnall, C.J. Lewnau, W.P. Bullock, H.M. Wilson, J.M. Dunwell, J.A. Thompson e K. Wang. 1994. Production of fertile maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant J.* 6:941-948.

Fukumori, F. e R.P. Hausinger. 1993. Purification and characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317.

Gamborg, O.L., R. A. Miller e K. Ojima. 1968. Nutirent requirements of suspensions of cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.

Gay, P., D. Le Coq , M. Steinmetz, E. Ferrari e J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Eschericia coli*. *J. Bacteriol.* 153:1424-1431.

Gianessi, L. R. 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant cultures. *Pest. Manag. Sci.* 61:241-245.

Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 18 de Março de 2005. Disponível em weedsceince.com.

Hiei Y., T. Komari e T. Kubo. 1997. Tranformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.* 35:205-218.

Hiei, Y., T. Komari (1997) Method for Transforming Monocotyledons. Patente U.S. 5 591 616.

Hinchee M.A.W., D.V. Conner-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922.

Höfte, H. e H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.

Hoekema, A. 1985. In: *The Binary Planta Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Capitulo 5.

Hogan, D.A.; S.R. Smith, E.A. Saari, J. McCracken, R.P. Hausinger. 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 275:12400-12409.

Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu e J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen. Genet.* 163:181-187.

Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers e R. Fraley. 1988. In *Planta Molecular Biology Manual*, S. Gelvin *et al.*, ed., Kluwer Academic Publishers, Boston

Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl e F. Streichsbier. 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-Dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 33:213-216.

Jefferson, R. A. M. Bevan e T. Kavanagh. 1987. The use of *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 17-19.

Karlin, S. e S.F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. PNAS 87:2264-2268.

Karlin, S. e S.F. Altschul. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. PNAS 90:5873-5877

Keller, G.H. e M.M. Manak. 1987. DNA Probes. Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.

Kohler, H.P.E. 1999. *Sphingobium herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. J. Ind Microbiol and Biotech. 23:336-340.

Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet CM, Beachy RN (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep 12:250-255

Linsmaier, E.M. e F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hoawkes, P.H. Hollingshead, S.A.J. Arner e C. Preston. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74:62-73.

Luo, H., Q. Hu, K. Nelson, C. Longo, A. P. Kausch, J. M. Chandlee, J. K. Wipff e C. R. Fricker. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. Plant Cell Reports 22: 645-652.

Lyon, B.R., D. J. Llewellyn, J. L. Huppertz, E. S. Dennis e W. J. Peacock. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco confers resistance to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Plant Mol. Bio. 13:533-540.

Lyon, B.R., Y. L. Cousins, D. J. Llewellyn e E. S. Dennis. 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Transgenic Res.* 2: 166-169.

Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Martin, J.R. e W.W. Witt. 2002. Response of glyphosate tolerant and susceptible biotypes of horseweed (*Conyza canadensis*) to foliar applied herbicides. *Proc.North Cent.Weed Sci.Soc.* 57:185.

Martinell B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, H. Yong, D.E. McCabe, E.J. Williams. 2002. Soybean Agrobacterium transformation method. Pedido de patente U.S. 6384301

McCabe D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.

Miller S.D., P.W. Stahlman, P. Westra, G.W. Wicks, R.G. Wilson, J.M. Tichota. 2003. Risks of weed spectrum shifts and herbicide resistance in glyphosate-resistant cropping systems. *Proc.West.Soc.Weed Sci.* 56:61-62.

Muller R, S. Jorks, S. Kleinsteuber, W. Babel. 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides diclorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. *Microbiol. Res.* 154:241-246.

Murashige T. e F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Murphy G.P., T.E. Dutt, RF. Montgomery, T.S. Willard, G.A. Elmore. 2002. Control of horseweed with glyphosate. Proc.North Cent.Weed Sci.Soc. 57:194.

Ng, C.H., R Wickneswari, S. Salmigah, Y.T. Teng e B.S. Ismail. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. Weed Res. 43:108-115.

Olhoft P.M. e D.A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711

Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan e D.A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta 216:723-735

Padgett S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. La Vallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor e G.M. Kishore. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. 1995;35:1451-1461.

Parrott W.A., J. N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma e C.N. Stewart, Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P:144-149:

Popelka, J. C. e F. Altpeter 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L) Mol. Breed 11:203-211

Saari, R.E., D.A. Hogan e R.P. Hausinger. 1999. Stereospecific degradation of the pheonxypropionate herbicide diclorprop. J. Mol. Catal. B: Enz. 6:421-428.

Saiki, R K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich e N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.

Sambrook, J., E.F. Fritsch e T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press.

Sambrook, J. e D.W. Russell. 2000. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schenk, R.U. e A.C. Hildebrandt (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

Sfiligoj, E. 2004. Spreading resistance. *Crop Life*. Fascículo de Março.

Simarmata, M., J.E. Kaufmann e D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51:678-682.

Singh R.J., T.M. Klein, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C.M. Kostow. Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor. Appl. Genet.* 1998; 96:319-324.

Smejkal, C.W., T. Vallaey, S.K. Burton e H.M. Lappin-Scott. 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related *tfdA* gene types. *Biol. Fertil. Sols* 33:507-513.

Streber, W. e L. Willmitzer. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology* 7:811-816.

Streber, W.R., K.N. Timmis e M. H. Zenk. 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. *Pat. US 6 153 401*.

Streber, W.R., K.N. Timmis e M.H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-Dichlorophenoxiacetic monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169:2950-2955.

Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura e R.B. Wallace. 1981. ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.

Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, W. Mingbo, S. Thornton e R. Bretell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11:1369-1376.

Weigel, D. e J. Glazebrook. 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 358 p.

Weising, K., J. Schell e G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477.

Welter, M.E., D.S. Clayton, M.A. miler e J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. *Plant Cell Rep.* 14:725-729.

Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel. 2002. The two enantiospecific diclorprop/ α -ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1-protein and sequence data of *RdpA* and *SdpA*. *Microbiol. Res.* 157:317-22.

Westendorf, A., R.H. Muller e W. Babel. 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. *Acta Biotechnol.* 23: 3-17.

WSSA. 2002. *Herbicide Handbook* (8^a ed). Weed Science Society of America. Lawrence, KS 492 p.

Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang e J. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 22: 478 - 482.

Zhang S (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Planta Cell Rep* 15:68-71

Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy RN, Fauquet CM (1996) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Plant Cell Rep* 15:465-469.

Zhang S, Song W, Chen L, Ruan D, Taylor N, Ronald P, Beachy RN, Fauquet CM (1998) Transgenic elite Indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Breed* 4:551-558.

Zhang, Z., A. Xing, P.E. Staswick e T. E. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 56:37-46.

Zhao, Z.Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer e D. Pierce. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation, *Plant Mol. Biol.* 44:789-798.

Zipper, C., M. Bunk, A. Zehnder, H. Kohler. 1998. Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide diclorprop [(RS)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)propanoic acid] by *Sphingobium herbicidovorans* MH. *J. Bact.* 13:3368-3374

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> Novos genes de resistência a herbicida

<130> 502-14 T4

<140> 05 771 746.4

<141> 2005-05-02

<150> US 60/567 052

<151> 2004-04-30

<160> 32

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 50

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador directo usado para amplificar o gene rdpA/AAD-1 (v1)

<400> 1

tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtcccccc tctcccagcg 50

<210> 2

<211> 38

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador inverso usado para amplificar o gene rdpA/AAD-1 (v1)

<400> 2

ctcgagttac tagcgcgccg ggcgcacgcc accgaccg 38

<210> 3

<211> 915

<212> ADN

<213> Sphingobium herbicidovorans

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (18)

<223> Ligante de iniciador

<220>

<221> misc_feature

<222> (907)..(915)

<223> Ligante de iniciador

<400> 3

```
tctagaagga gatataccat gcatgetgca ctgtccccc tctcccagcg ctttgagcgc      60
atcgcggtcc agccgctgac cggcgtcctg ggcgccgaga tcaccggcgt cgacctgcgc      120
gagccgctcg acgacagcac ctggaacgaa atcctcgacg cgttccacac ttaccaggtc      180
atctattttc cgggccaggc gatcaccaac gaacagcaca tcgccttcag ccggcgcttc      240
ggccccgtcg atcccgtgcc cctgctcaag agcatogaag ggtatccaga ggtgcagatg      300
atccgcccgcg aagccaacga aagcgggctg gtgatcgggtg aygactggca caccgacagc      360
accttctctgg acgcaccgcc ggccgcctgtg gtgatgcgcg cgatcgacgt gcccgagcat      420
ggcggcgaca ccggttttct gagcatgtac acccgcgtggg agacgctgtc gccaccatg      480
caggccaacca tcgaagggtt gaacgtagtg cacagcgcca cgcgtgtgtt cggctcgttc      540
taccaggccc agaaccggcg cttcagcaac accagcgtca aggtgatgga cgtcgacgcg      600
ggcgaccgtg aaaccgtgca ccccctggtg gtgaccatc cgggcagcgg ccgcaagggc      660
ctgtacgtga accaggctta ttgccagcgc atcgagggca tgaccgatgc cgaaagcaaa      720
ccgctgctgc agttcctgta cgagcatgcg acacggttcg atttcacctg ccgctgctgc      780
tggaagaagg accaggctct ggtctgggac aacctgtgca cgatgcaccg ggccgtaccc      840
gactacgcgg gcaagttccg ctacctgacg cgcaccacgg tcggtggcgt gcgcccggcg      900
cgctagtaac tcgag                                                                915
```

<210> 4

<211> 897

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência primária de AAD-1 (v2)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> ligante de iniciador

<220>

<221> misc_feature

<222> (891)..(897)

<223> ligante de iniciador

<400> 4

```

ccatggctgc tgcactgtcc cccctctccc agcgctttga gcgcatcgcg gtccagccgc      60
tgaccggcgt cctgggcgcc gagatcacccg gcgtcgacct gcgcgagccg ctcgacgaca      120
gcacctggaa cgaaatcttc gacgcgttcc acacttacca ggtcatctat ttcccggcc      180
aggcgatcac caacgaacag cacatcgctt tcagccggcg cttcggcccc gtcgatcccg      240
tgcccctgct caagagcadc gaagggatcc cagaggtgca gatgatccgc cgcgaagcca      300
acgaaagcgg gcgtgtgac ggtgatgact ggcacaccga cagcaccttc ctggacgcac      360
cgccggccgc cgtgggtgat gcgcgcatcg acgtgcccga gcatggcggc gacaccggtt      420
ttctgagcat gtacaccgcg tgggagacgc tgtcgcgccac catgcaggcc accatcgaag      480
ggttgaacgt agtgcacagc gccacgcgtg tgttcggctc gctctaccag gcccagaacc      540
ggcgcttcag caacaccagc gtcaaggtga tggacgtcga cgcgggcgac cgtgaaaccg      600
tgcacccctt ggtggtgacc catccgggca gcggctgcaa gggcctgtac gtgaaccagg      660
tctattgcca gcgcatcgag ggcgatgacc atgccgaaag caaacgctg ctgcagttcc      720
tgtacagca tgcgacacgg ttcgatttca cctgccgctg gcgctggaag aaggaccagg      780
tcctggtctg ggacaacctg tgcacgatgc accgggcccgt acccgactac gcgggcaagt      840
tccgctacct gacgcgcacc acggtcggtg gcgtgcgcc gccgcgctag tgagctc      897

```

<210> 5

<211> 919

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência primária de AAD-1 (v3)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (2)

<223> ligante de iniciador

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) .. (8)

<223> codão de alanina adicional (GCT)

<220>

<221> misc_feature

<222> (894)..(919)

<223> ligante de iniciador

<400> 5

ccatggctca tgctgccctc agccctctct cccaacgctt tgagagaata gctgtccagc 60
 cactcactgg tgccttgggt gctgagatca ctggagtgga cttgagggaa ccacttgatg 120
 acagcacctg gaatgagata ttggatgcct tccacactta ccaagtcatc tactttcctg 180
 gccaaagcaat caccaatgag cagcacattg cattctcaag aaggtttggg ccagttgatc 240
 cagtgcctct tctcaagagc attgaaggct atccagaggt tcagatgatc cgcagagaag 300
 ccaatgagtc tggaaaggtg attggtgatg actggcacac agactccact ttccttgatg 360
 cacctccagc tgcgtttgtg atgagggcca tagatgttcc tgagcatggc ggagacactg 420
 ggttcctttc aatgtacaca gcttgggaga cttgtctcc aaccatgcaa gccaccatcg 480
 aagggtcaa cgttgtgac tctgccacac gtgtgttcgg ttcctctac caagcacaga 540
 accgtcgctt cagcaacacc tcagtcaagg tgatggatgt tgatgctggt gacagagaga 600
 cagtccatcc cttggttgtg actcatcctg gctctggaag gaaaggcctt tatgtgaatc 660
 aagtctactg tcagagaatt gagggcatga cagatgcaga atcaaagcca ttgcttcagt 720
 tcctctatga gcattgccacc agatttgact tcaattgccc tgtgaggtgg aagaaagacc 780
 aagtccttgt ctgggacaac ttgtgcacca tgcaccgtgc tgttcctgac tatgctggca 840
 agttcagata cttgactcgc accacagttg gtggagttag gcctgcccgc tgagtagtta 900
 gcttaatcac ctgagagctc 919

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador 5' rdpA(ncoI)

<400> 6

cccatggctg ctgcactgtc cccctctcc 30

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador 3' sacI

<400> 7

gagctcacta gcgcgccggg cgcacgccac cga 33

<210> 8

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador 5' BstEII/ Del NotI

<400> 8

tggtggtgac ccatccgggc agcggctgca agggcc 36

<210> 9

<211> 295

<212> PRT

<213> *Sphingobium herbicidovorans*

<400> 9

Met	His	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Ala
1				5					10					15	
Val	Gln	Pro	Leu	Thr	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Thr	Gly	Val	Asp
			20					25					30		

Leu	Arg	Glu	Pro	Leu	Asp	Asp	Ser	Thr	Trp	Asn	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala
		35					40					45			

Phe	His	Thr	Tyr	Gln	Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Gly	Gln	Ala	Ile	Thr	Asn
	50					55					60				

Glu	Gln	His	Ile	Ala	Phe	Ser	Arg	Arg	Phe	Gly	Pro	Val	Asp	Pro	Val
65					70					75					80

Pro	Leu	Leu	Lys	Ser	Ile	Glu	Gly	Tyr	Pro	Glu	Val	Gln	Met	Ile	Arg
			85						90					95	

Arg	Glu	Ala	Asn	Glu	Ser	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Asp	Asp	Trp	His	Thr
			100					105						110	

Asp	Ser	Thr	Phe	Leu	Asp	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Val	Val	Met	Arg	Ala
		115					120						125		

Ile	Asp	Val	Pro	Glu	His	Gly	Gly	Asp	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser	Met	Tyr
	130					135					140				

Thr	Ala	Trp	Glu	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Met	Gln	Ala	Thr	Ile	Glu	Gly
145					150					155					160

Leu	Asn	Val	Val	His	Ser	Ala	Thr	Arg	Val	Phe	Gly	Ser	Leu	Tyr	Gln
				165					170						175

Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
 180 185 190

Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
 195 200 205

Gly Ser Gly Arg Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
 210 215 220

Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
 225 230 235 240

Tyr Glu His Ala Thr Arg Phe Asp Phe Thr Cys Arg Val Arg Trp Lys
 245 250 255

Lys Asp Gln Val Leu Val Trp Asp Asn Leu Cys Thr Met His Arg Ala
 260 265 270

Val Pro Asp Tyr Ala Gly Lys Phe Arg Tyr Leu Thr Arg Thr Thr Val
 275 280 285

Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
 290 295

<210> 10
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Tradução de AAD-1 v2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Diferente de v1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (212) .. (212)
 <223> Diferente de v1

<400> 10
 Met Ala Ala Ala Leu Ser Pro Leu Ser Gln Arg Phe Glu Arg Ile Ala
 1 5 10 15

Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val Asp
 20 25 30

Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp Ala
 35 40 45

Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr Asn
 50 55 60

Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro Val
 65 70 75 80

Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
 85 90 95

Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His Thr
 100 105 110

Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg Ala
 115 120 125

Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met Tyr
 130 135 140

Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu Gly
 145 150 155 160

Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln
 165 170 175

Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
 180 185 190

Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
 195 200 205

Gly Ser Gly Cys Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
 210 215 220

Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
 225 230 235 240

Tyr Glu His Ala Thr Arg Phe Asp Phe Thr Cys Arg Val Arg Trp Lys
 245 250 255

Lys Asp Gln Val Leu Val Trp Asp Asn Leu Cys Thr Met His Arg Ala
 260 265 270

Val Pro Asp Tyr Ala Gly Lys Phe Arg Tyr Leu Thr Arg Thr Thr Val
 275 280 285

Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
 290 295

<210> 11
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Tradução de AAD-1 v3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (3)
 <223> Diferente de V1

<400> 11

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

Pro Gly Ser Gly Arg Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln
 210 215 220

Arg Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe
 225 230 235 240

Leu Tyr Glu His Ala Thr Arg Phe Asp Phe Thr Cys Arg Val Arg Trp
 245 250 255

Lys Lys Asp Gln Val Leu Val Trp Asp Asn Leu Cys Thr Met His Arg
 260 265 270

Ala Val Pro Asp Tyr Ala Gly Lys Phe Arg Tyr Leu Thr Arg Thr Thr
 275 280 285

Val Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
 290 295

<210> 12

<211> 888

<212> ADN

<213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 12

atgacgatcg ccattccggca gcttcagacg cattttgtcg gccaggtttc cggcctcgat 60
 ttgcgaaagc cgctcacgcc gggcgaggcc cgcgaggctc agtccgccat ggacaaaatac 120
 gcggtgctcg ttttccacga ccaggacatc accgacgagc agcagatggc tttecgctg 180
 aacttcggcc agcgcgagga cgcgcgcggc ggcacgggtca ccaaggagaa ggactaccgg 240
 ctgcaatccg gcttgaacga cgtctccaat ctcggaagg acggcaagcc gctggccaag 300
 gacagccgca cgcacctgtt caatctcggc aactgcctct ggcaactcga cagctcgttc 360
 cgtcccattc ccgaaaatt ctcgctgctg tcggcgcgcg tggatgaacc gacgggcggc 420
 aacaccgaat tcgcggacat gcgcgccgcc tatgaacgcg tcgacgacga gaccaaggcc 480
 gaaatcgagg acctcgtctg cgagcactcg ctgatgtatt cgcgcggctc gctcggttc 540
 accgagtaca ccgacgaaga gaagcagatg ttcaagccgg tctgcaacg cctcgtgccc 600
 acccatccgg tccaccgcc caagtcgctg tatctctcgt cgcagccgg caagatcgcc 660
 agcatgagcg tgccggaggg gcggctgctg ttgcgcgac tcaacgagca cgcgacgagc 720
 ccggaattcg tctacgtcca caaatggaag ctgcatgacc tcgtgatgtg ggacaaccgc 780
 cagaccatgc acccgtcgg ccgctacgac cagtcaccgc cccgcgacat gcgcgcgccc 840
 acggtggcgg ggacggagcc gacggtgcag cagcaggcgg cggagtag 888

<210> 13

<211> 289

<212> PRT

<213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 13

Met Thr Ile Ala Ile Arg Gln Leu Gln Thr His Phe Val Gly Gln Val
 1 5 10 15

Ser Gly Leu Asp Leu Arg Lys Pro Leu Thr Pro Gly Glu Ala Arg Glu
 20 25 30

Val Glu Ser Ala Met Asp Lys Tyr Ala Val Leu Val Phe His Asp Gln
 35 40 45

Asp Ile Thr Asp Glu Gln Gln Met Ala Phe Ala Leu Asn Phe Gly Gln
 50 55 60

Arg Glu Asp Ala Arg Gly Gly Thr Val Thr Lys Glu Lys Asp Tyr Arg
 65 70 75 80

Leu Gln Ser Gly Leu Asn Asp Val Ser Asn Leu Gly Lys Asp Gly Lys
 85 90 95

Pro Leu Ala Lys Asp Ser Arg Thr His Leu Phe Asn Leu Gly Asn Cys
 100 105 110

Leu Trp His Ser Asp Ser Ser Phe Arg Pro Ile Pro Ala Lys Phe Ser
 115 120 125

Leu Leu Ser Ala Arg Val Val Asn Pro Thr Gly Gly Asn Thr Glu Phe
 130 135 140

Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Asp Glu Thr Lys Ala
 145 150 155 160

Glu Ile Glu Asp Leu Val Cys Glu His Ser Leu Met Tyr Ser Arg Gly
 165 170 175

Ser Leu Gly Phe Thr Glu Tyr Thr Asp Glu Glu Lys Gln Met Phe Lys
 180 185 190

Pro Val Leu Gln Arg Leu Val Arg Thr His Pro Val His Arg Arg Lys
 195 200 205

Ser Leu Tyr Leu Ser Ser His Ala Gly Lys Ile Ala Ser Met Ser Val
 210 215 220

Pro Glu Gly Arg Leu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Glu His Ala Thr Gln
 225 230 235 240

<210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> NcoI de Brady

<400> 18
tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt 32

<210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> SacI de Brady

<400> 19
gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

<210> 20
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Glycine max

<400> 20

Met Ala Gln Val Ser Arg Val His Asn Leu Ala Gln Ser Thr Gln Ile
 1 5 10 15

Phe Gly His Ser Ser Asn Ser Asn Lys Leu Lys Ser Val Asn Ser Val
 20 25 30

Ser Leu Arg Pro Arg Leu Trp Gly Ala Ser Lys Ser Arg Ile Pro Met
 35 40 45

His Lys Asn Gly Ser Phe Met Gly Asn Phe Asn Val Gly Lys Gly Asn
 50 55 60

Ser Gly Val Phe Lys Val Ser Ala Ser Val Ala Ala Ala Glu Lys Pro
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Pro Glu Ile Val Leu Glu Pro Ile Lys Asp Phe Ser Gly
 85 90 95

Thr Ile Thr Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Tyr
 115 120 125

Ser Glu Asp Ile His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 130 135 140

Arg Val Glu Asp Asp Lys Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Phe Pro Thr Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu
 165 170 175

Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val
 180 185 190

Val Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg
 195 200 205

Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu
 210 215 220

Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg
 225 230 235 240

Val Asn Gly Lys Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly
 245 250 255

Ser Val Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu
 260 265 270

Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val
 275 280 285

Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser
 290 295 300

Val Glu His Ser Gly Asn Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln
 305 310 315 320

Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser
 325 330 335

Ala Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr
 340 345 350

Val Asn Gly Cys Gly Thr Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala
 355 360 365

Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser
 370 375 380

Val Thr Val Ser Gly Pro Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu
 385 390 395 400

Arg Gly Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr
 405 410 415

Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp
 420 425 430

Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys
 435 440 445

Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr
 450 455 460

Cys Val Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr
 465 470 475 480

Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly
 485 490 495

Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe
 500 505 510

Pro Asp Tyr Phe Glu Val Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
 515 520 525

<210> 21

<211> 525

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína EPSPS de soja com mutação dupla: treonina 183
 convertida para isoleucina; prolina 187 convertida para serina

<400> 21

Met Ala Gln Val Ser Arg Val His Asn Leu Ala Gln Ser Thr Gln Ile
 1 5 10 15

Phe Gly His Ser Ser Asn Ser Asn Lys Leu Lys Ser Val Asn Ser Val
 20 25 30

Ser Leu Arg Pro Arg Leu Trp Gly Ala Ser Lys Ser Arg Ile Pro Met
 35 40 45

His Lys Asn Gly Ser Phe Met Gly Asn Phe Asn Val Gly Lys Gly Asn
 50 55 60

Ser Gly Val Phe Lys Val Ser Ala Ser Val Ala Ala Ala Glu Lys Pro
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Pro Glu Ile Val Leu Glu Pro Ile Lys Asp Phe Ser Gly
 85 90 95

Thr Ile Thr Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Tyr
 115 120 125

Ser Glu Asp Ile His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 130 135 140

Arg Val Glu Asp Asp Lys Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Phe Pro Thr Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu
 165 170 175

Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val
 180 185 190

Val Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg
 195 200 205

Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu
 210 215 220

Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg
 225 230 235 240

Val Asn Gly Lys Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly
 245 250 255

Ser Val Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu
 260 265 270

Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val
275 280 285

Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser
290 295 300

Val Glu His Ser Gly Asn Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln
305 310 315 320

Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser
325 330 335

Ala Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr
340 345 350

Val Asn Gly Cys Gly Thr Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala
355 360 365

Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser
370 375 380

Val Thr Val Ser Gly Pro Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu
385 390 395 400

Arg Gly Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr
405 410 415

Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp
420 425 430

Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys
435 440 445

Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr
450 455 460

Cys Val Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr
465 470 475 480

Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly
485 490 495

Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe
500 505 510

Pro Asp Tyr Phe Glu Val Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
515 520 525

<210> 22

<211> 1604

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de ADN desviada para soja que codifica para EPSPS com mutação dupla divulgada em SEQ ID NO:21, com sequência adicionada

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1575)

<223> Sequência de codificação da sequência de ADN desviada para soja que codifica para a proteína EPSPS de SEQ ID NO:21

<220>

<221> misc_feature

<222> (1576)..(1578)

<223> Terminador de tradução tga

<220>

<221> misc_feature

<222> (1579)..(1604)

<223> Sequência incluída para introduzir codões de paragem de tradução em todos os seis quadros de leitura abertos e para introduzir um local de reconhecimento de enzima de restrição SacI com objectivos de clonagem

<400> 22

```

atggctcaag tctcccggtg tcacaatctt gctcagtc aa ccaaatctt tggacattca      60
agcaactcaa acaaaactgaa gtctgtgaat tetgtctcac ttcgcccacg cctttggggg      120
gcatccaaga gtgcataacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cttcaatggt      180
gggaaaggca attctgggtg cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaacct      240
agcacttccc ctgagattgt tcttgaacct attaaggact tcagtggaac aatcactctg      300
cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaacc      360
actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga      420
actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt      480
ggtggttgtt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttgtt tcttggcaat      540
gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctggtgg gaatgcaagt      600
tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggcca tcggtgacct tgtggctggc      660
ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgccc tccagtgaga      720
gtgaatggga agggagggtt gctctgtgga aaggtaaac tgagtggatc agtctcttcc      780
cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagattgaa      840

```

atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaaatga ccctcaaact catggagagg 900
 tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcgtt tccttgtaaca tggaggtcag 960
 aagtacaaaa gccttggcaa tgcctttggt gaaggggatg caagctctgc ttcctatctc 1020
 ttggctgggg ctgccatcac tgggtggacc atcactgtga atggctgtgg cacctcatcc 1080
 cttcaagggtg atgtaaagtt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgcca ggtcacctgg 1140
 tctgagaaca gtgtaactgt gtctggacct cccagagact tcagtggcag aaaggttctc 1200
 cgtggaattg atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccatgaccct cgctgttgta 1260
 gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg cttcatggag ggtgaaggag 1320
 acagagagga tgattgccat ttgcacagaa ctccgcaaac ttggtgcaac agttgaagag 1380
 ggaccagatt actgtgtgat aacccacct gagaagctca atgtgacagc cattgacacc 1440
 tatgatgacc acagaatggc aatggcttcc tcccttgctg cctgtggtga tgtgcctgtg 1500
 actatcaaag accctgggtg cacaaggaag acatttccag actactttga agttttggag 1560
 aggttgacaa agcactgagt agttagctta atcacctaga gctc 1604

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador Pat 5-3

<400> 23
agataccctt ggttggtgc 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador Pat 3-3

<400> 24
cagatggatc gtttgaag 20

<210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador directo AAD-1 PTU

<400> 25
ataatgccag cctgttaaac gcc 23

<210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador inverso AAD-1 PTU

<400> 26
ctcaagcata tgaatgacct cga 23

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador directo para PCR de região de codificação de AAD-1 (RdpAcodF)

<400> 27
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador inverso para PCR de região de codificação de AAD-1 (RdpAcodR)

<400> 28
cgggcaggcc taactccacc aa 22

<210> 29
 <211> 932
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Nucleótidos otimizados para planta de AAD-2 v2

<400> 29
 ccatggctac catagcaatc agacagctcc agaccactt tgtgggtcaa gtttctggat 60
 tggacctcag aaagccactc actcctggag aagccagaga agttgaatca gctatggaca 120
 agtacgcagt tcttgtcttc catgaccaag acatcacaga tgagcaacag atggcctttg 180
 ccctcaactt tggtcagagg gaggatgcac gtggtggcac tgtcaccaa gagaaggatt 240
 accgtcttca gtctggcctc aatgatgttt ccaacttggg caaagatgga aagccacttg 300
 ccaaggacag cgcacccat ttgttcaacc ttggaactg cttgtggcat tctgactcca 360
 gcttcagacc aatcccagcc aagttcagcc tcctttctgc tegtgttgtg aaccaactg 420

gtgggaacac tgagtttgc t gacatgagag ctgcctatga tgctcttgac gatgaaacca 480
 aagctgagat tgaggacctt gtgtgtgagc actctctcat gtactcaagg ggctcacttg 540
 gcttctactga gtacacagat gaagagaagc aaatgttcaa gcccgctcttg cagcgcttgg 600
 tccgcacaca cctgtgacac cgtcgcaaat cactctacct ctccagccat gccggaaga 660
 ttgccagcat gtccgtccct gaagggaggc tccttttgag ggatttgaat gaacatgcta 720
 ctgagcctga gttcgtctat gttcacaat ggaagttgca tgatcttctg atgtgggaca 780
 ataggcaaac catgcacaga gtgaggagat atgaccagtc ccaaccaga gacatgcgcc 840
 gtgcaacagt tgctgggacc gagcccacag tgcaacagca agcagcagag tgagtagtta 900
 gcttaatcac ctagagctcg gtcaccagat ct 932

<210> 30

<211> 296

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína AAD-2 v2 traduzida

<400> 30

Met Ala Thr Ile Ala Ile Arg Gln Leu Gln Thr His Phe Val Gly Gln
 1 5 10 15

Val Ser Gly Leu Asp Leu Arg Lys Pro Leu Thr Pro Gly Glu Ala Arg
 20 25 30

Glu Val Glu Ser Ala Met Asp Lys Tyr Ala Val Leu Val Phe His Asp
 35 40 45

Gln Asp Ile Thr Asp Glu Gln Gln Met Ala Phe Ala Leu Asn Phe Gly
 50 55 60

Gln Arg Glu Asp Ala Arg Gly Gly Thr Val Thr Lys Glu Lys Asp Tyr
 65 70 75 80

Arg Leu Gln Ser Gly Leu Asn Asp Val Ser Asn Leu Gly Lys Asp Gly
 85 90 95

Lys Pro Leu Ala Lys Asp Ser Arg Thr His Leu Phe Asn Leu Gly Asn
 100 105 110

Cys Leu Trp His Ser Asp Ser Ser Phe Arg Pro Ile Pro Ala Lys Phe
 115 120 125

Ser Leu Leu Ser Ala Arg Val Val Asn Pro Thr Gly Gly Asn Thr Glu
 130 135 140

Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Asp Glu Thr Lys
 145 150 155 160

Ala Glu Ile Glu Asp Leu Val Cys Glu His Ser Leu Met Tyr Ser Arg
 165 170 175

Gly Ser Leu Gly Phe Thr Glu Tyr Thr Asp Glu Glu Lys Gln Met Phe
 180 185 190

Lys Pro Val Leu Gln Arg Leu Val Arg Thr His Pro Val His Arg Arg
 195 200 205

Lys Ser Leu Tyr Leu Ser Ser His Ala Gly Lys Ile Ala Ser Met Ser
 210 215 220

Val Pro Glu Gly Arg Leu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Glu His Ala Thr
 225 230 235 240

Gln Pro Glu Phe Val Tyr Val His Lys Trp Lys Leu His Asp Leu Val
 245 250 255

Met Trp Asp Asn Arg Gln Thr Met His Arg Val Arg Arg Tyr Asp Gln
 260 265 270

Ser Gln Pro Arg Asp Met Arg Arg Ala Thr Val Ala Gly Thr Glu Pro
 275 280 285

Thr Val Gln Gln Gln Ala Ala Glu
 290 295

<210> 31

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador directo de PCR de fragmento de "Southern" AAD-1

<400> 31

atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 32

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador inverso de PCR de fragmento de "Southern" AAD-1

<400> 32

gggcaggcct aactccacca a 21

Lisboa, 2013-05-06

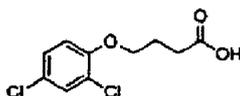
REIVINDICAÇÕES

1. Método de controlo de pelo menos uma erva daninha numa área, em que a referida área compreende pelo menos uma planta transgénica, a referida planta transgénica compreendendo um polinucleótido isolado que codifica uma proteína que degrada enzimaticamente um herbicida seleccionado do grupo que consiste em um herbicida fenoxiauxínico e um herbicida ariloxifenoxipropionato, em que o referido polinucleótido hibrida sob condições rigorosas com a complementar completa de uma molécula de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO:9, em que a referida planta expressa o referido polinucleótido e produz a referida proteína, em que o referido método compreende a aplicação do referido herbicida na referida área.

2. Método da reivindicação 1 em que o referido método inclui a aplicação do referido herbicida na referida planta.

3. Método da reivindicação 1 em que o referido herbicida é um herbicida fenoxiauxínico, preferivelmente um herbicida 2,4-D.

4. Método da reivindicação 1 em que o referido herbicida compreende a seguinte estrutura química



ou um seu sal.

5. Método da reivindicação 1, em que a referida planta compreendendo ainda um ou mais outros genes de resistência a herbicidas.

6. Método da reivindicação 1, em que a referida planta compreende ainda uma característica de tolerância a glifosato e uma característica de tolerância a glufosinato, e em que o referido método compreende a aplicação de 2,4-D, glifosato, e glufosinato na referida área.

7. Método da reivindicação 1, em que a referida planta compreende ainda um gene para tolerância a dicamba, e em que o

referido método compreende a aplicação de dicamba na referida área.

8. Método da reivindicação 1, em que a referida planta compreende ainda um gene para tolerância a um herbicida que é um inibidor de acetolactato-sintase.

9. Método da reivindicação 1, em que a referida planta compreende ainda um gene para tolerância a glufosinato.

10. Método da reivindicação 1, em que a referida planta é uma planta de milho.

11. Método da reivindicação 1, em que o referido herbicida é aplicado num estado pré-plantio, pré-emergência, e/ou pós-emergência da referida planta.

12. Método da reivindicação 1, em que o referido método compreende plantar uma semente na referida área, e permitir que a referida semente cresça transformando-se na referida planta.

13. Método da reivindicação 12, em que a referida aplicação é conduzida pré-emergência da referida planta.

14. Método da reivindicação 1, em que a referida proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9 ou uma variante, em que a referida variante possui actividade de dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato, pelo menos uma deleção ou substituição conservativa de aminoácidos, e pelo menos 95% de identidade de sequência com SEQ ID NO:9.

15. Método da reivindicação 1 em que ervas daninhas resistentes a glifosfato são controladas num campo de plantas de cultura tolerantes a glifosfato.

16. Método da reivindicação 1, em que a referida área é um campo e o referido método compreende aplicar o referido herbicida no referido campo e plantar uma semente no referido campo nos 14 dias seguintes à aplicação do referido herbicida, e permitir que a referida semente cresça transformando-se na referida planta transgênica.

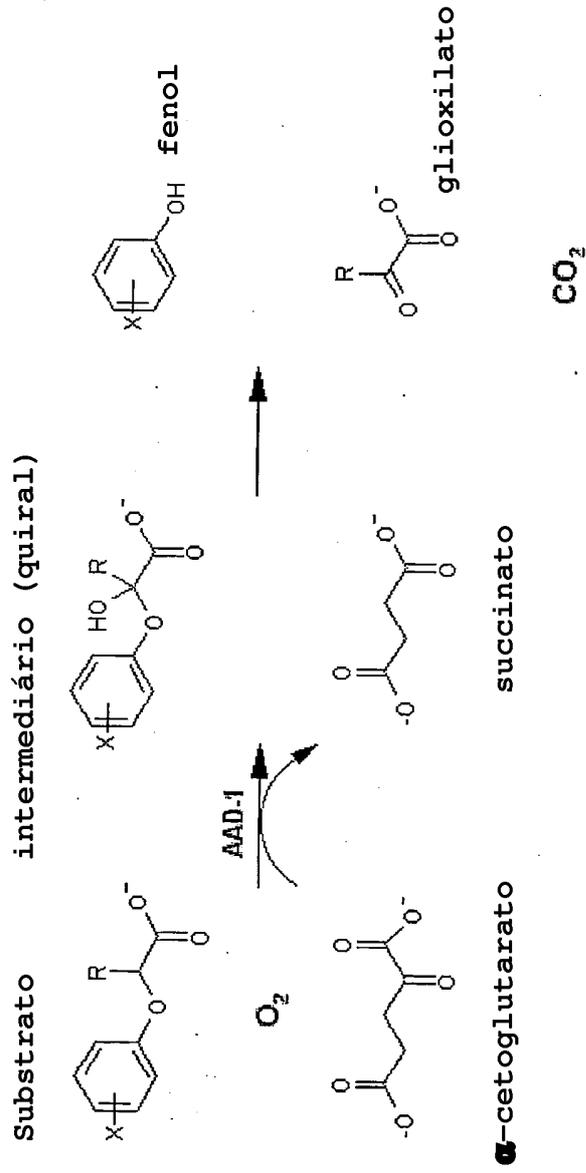
17. Método da reivindicação 1, em que o referido método compreende a aplicação de um herbicida parental na referida área.

18. Método da reivindicação 1, em que o referido método compreende a aplicação de um ou mais herbicidas na referida área, preferivelmente de maneira sequencial e/ou a partir de uma mistura em tanque ou simultaneamente.

19. Método de controlo de pelo menos uma erva daninha num campo, em que o referido campo contém pelo menos uma planta que compreende um polinucleótido isolado que codifica uma proteína que degrada enzimaticamente um herbicida seleccionado do grupo que consiste em uma fenoxiauxina e um ariloxifenoxipropionato, em que a referida molécula de ácido nucleico que codifica a referida proteína híbrida sob condições rigorosas com a complementar completa de uma sequência especificada por SEQ ID NO:5 e em que o referido polinucleótido está operativamente ligado a um promotor que é funcional numa célula vegetal, em que o método compreende a aplicação de uma combinação de herbicidas nos referidos campos.

20. Método da reivindicação 19, em que a referida combinação de herbicidas compreende 2,4-D.

Lisboa, 2013-05-06

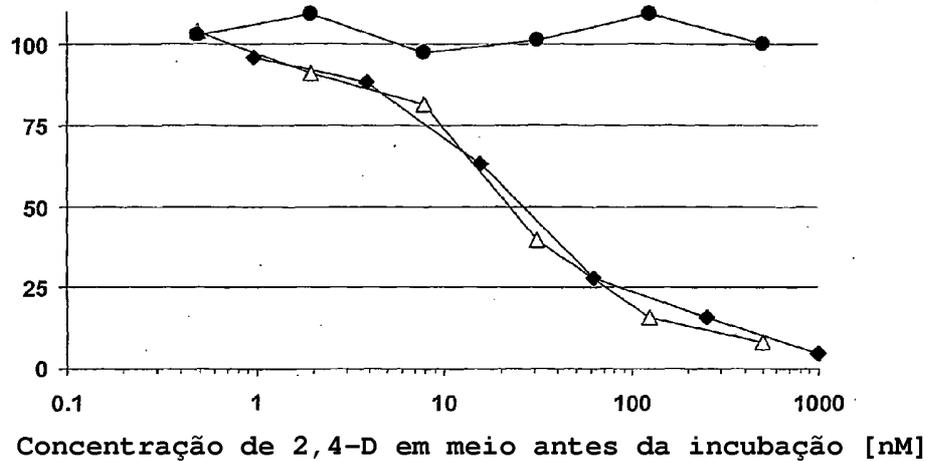


- A adição de O_2 é estereoespecífica
- A degradação de intermediários para fenol + glioxilato é espontânea

Fig. 1

Efeito de comprimento de raiz na placa de ensaio de Arabidopsis, provocado por solução de reacção de extracção de 2,4-D + AAD-1 (v1)

Comprimento da raiz - % de controlo



- ◆ Raiz de Arabidopsis EM2(+) I50 ~23 nM
- △ Raiz de Arabidopsis vector de controlo PET(+) I50 ~22 nM
- Raiz de Arabidopsis estirpe 3203(+) I50 >500 nM

Fig. 2

Raiz + rebento de agróstide. Efeito provocado por haloxifop + solução de reacção de extracção de AAD-1 (v1)

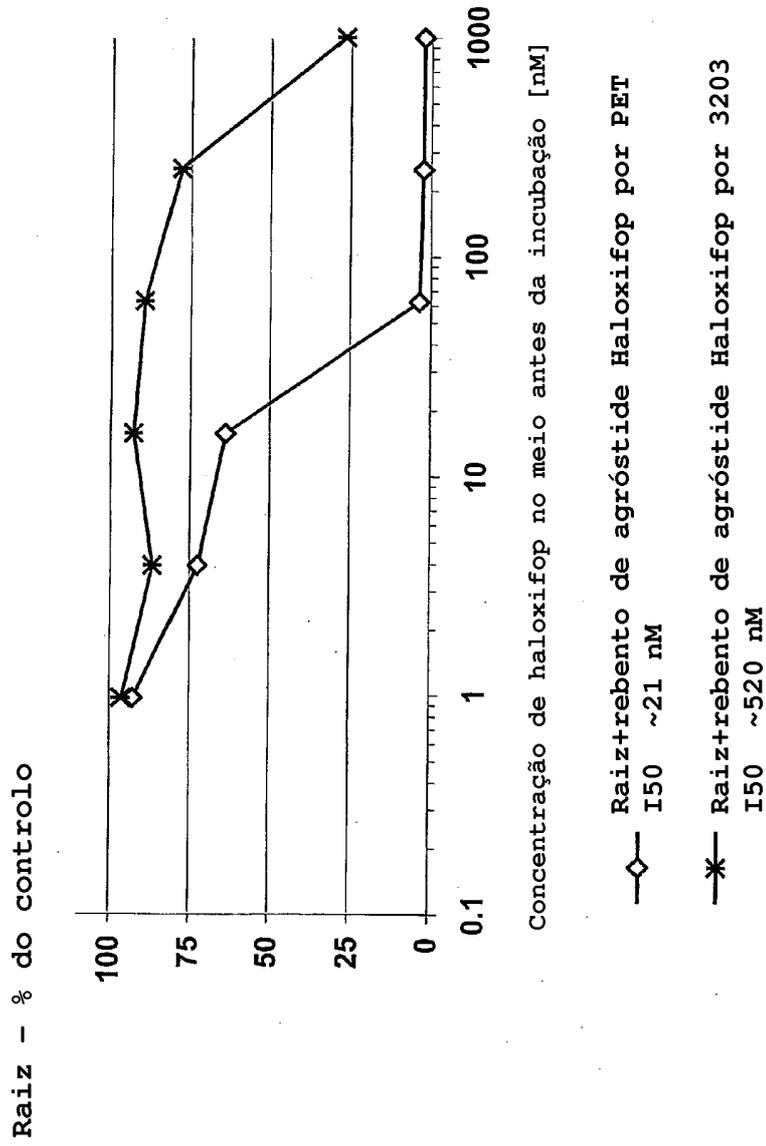


Fig. 3

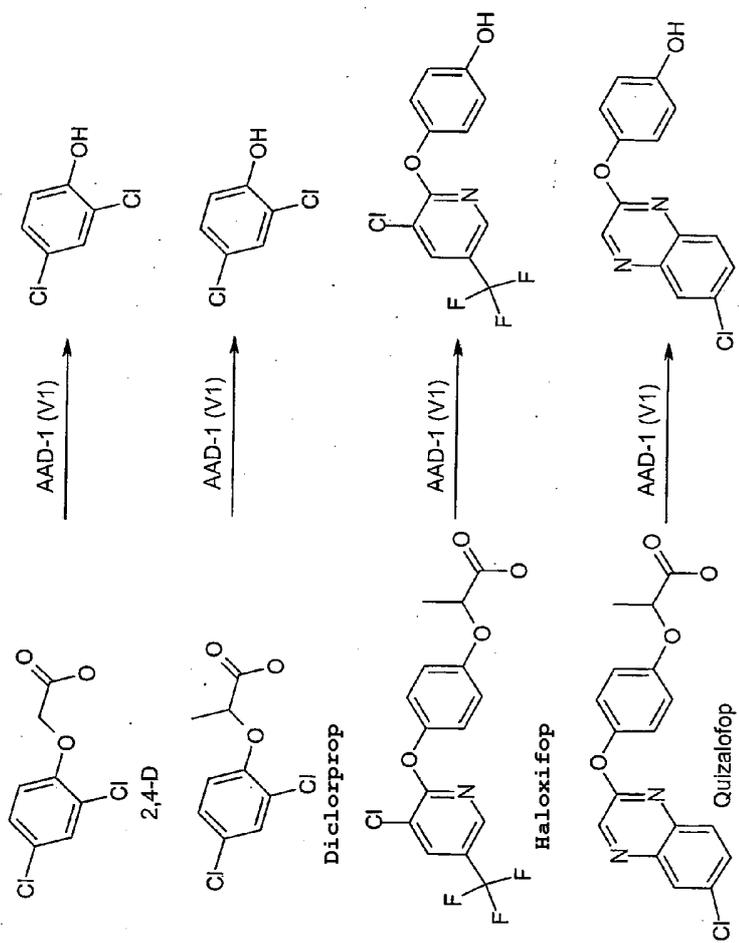


Fig. 4

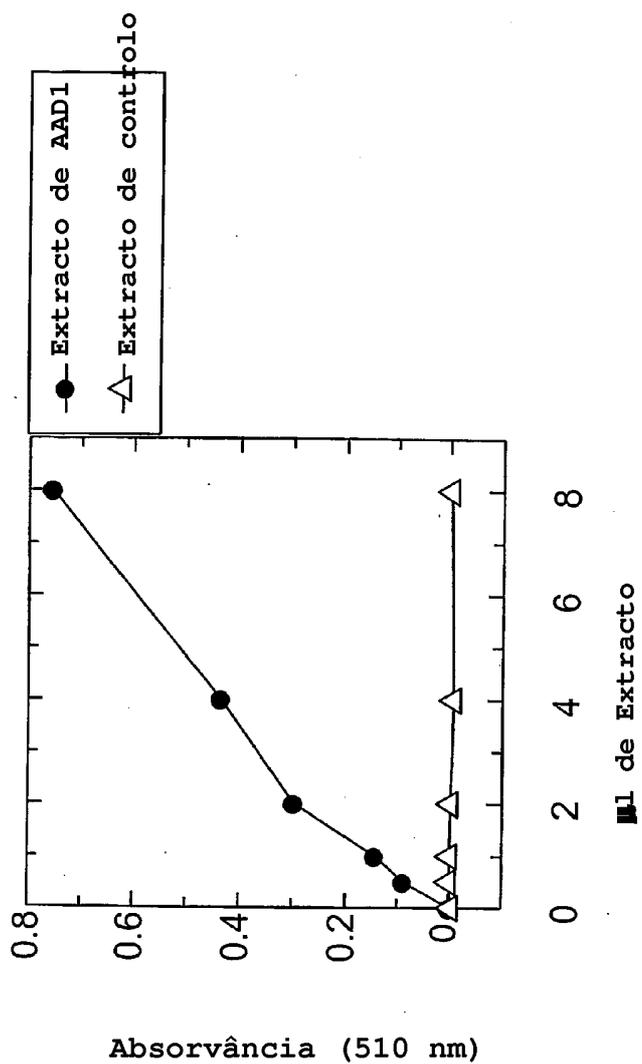


Fig. 5

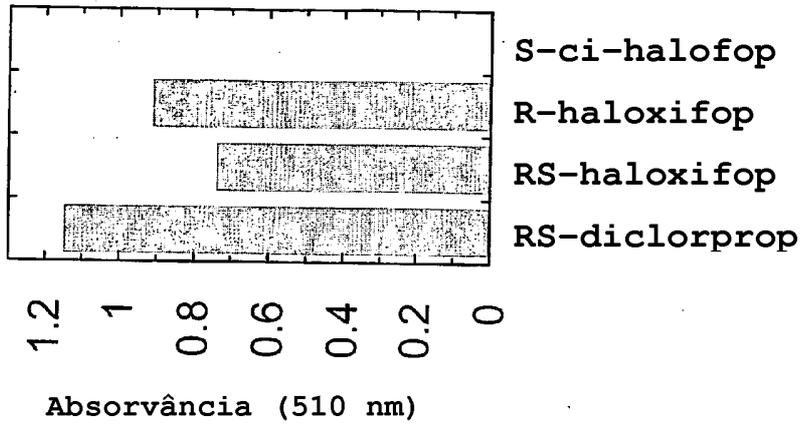


Fig. 6B

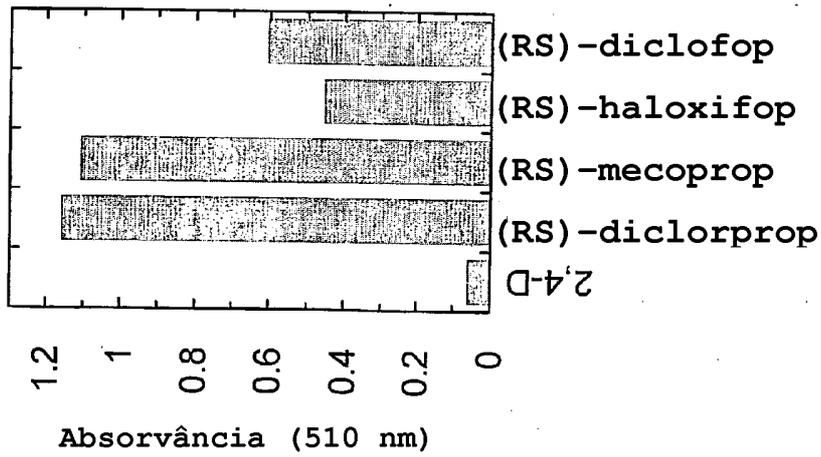


Fig. 6A

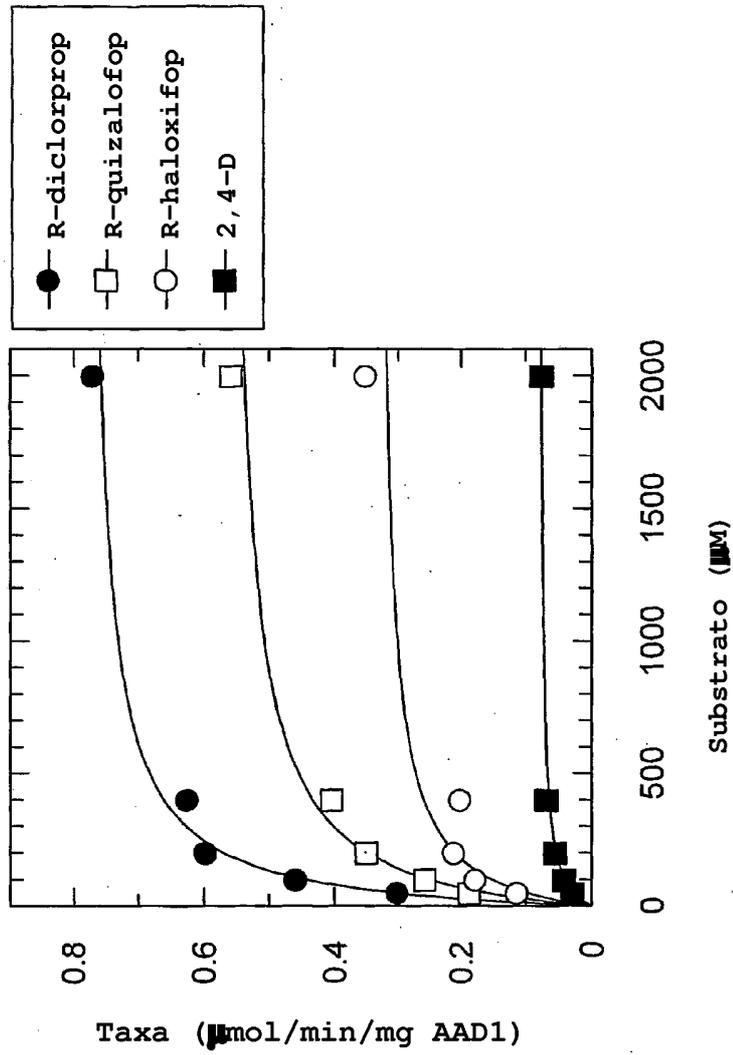


Fig. 7

% Expressão

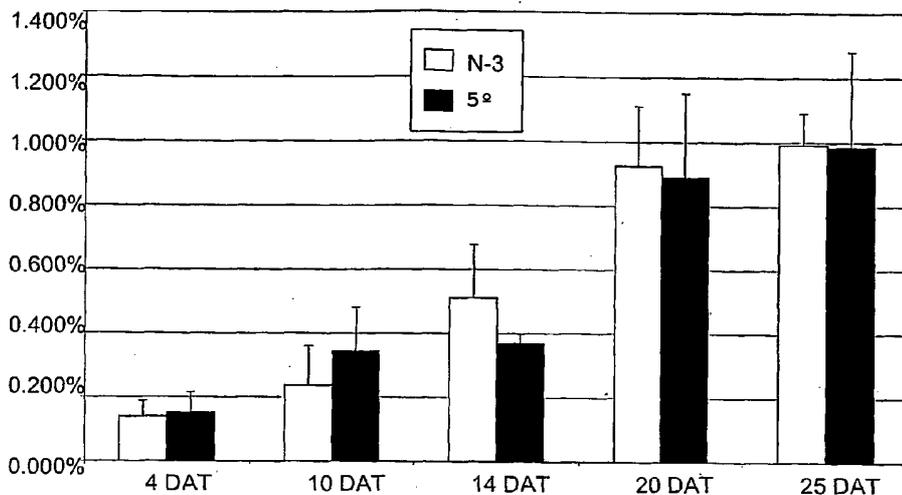


Fig. 8A

% Expressão

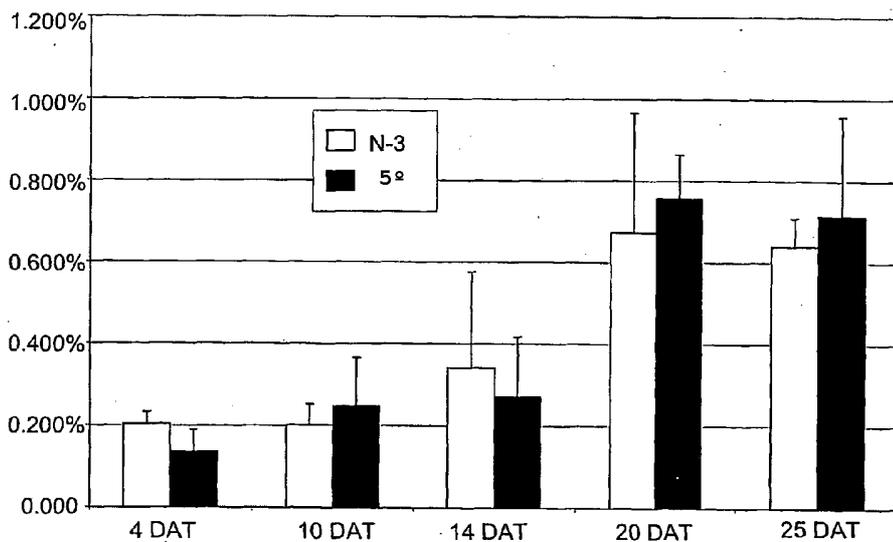


Fig. 8B

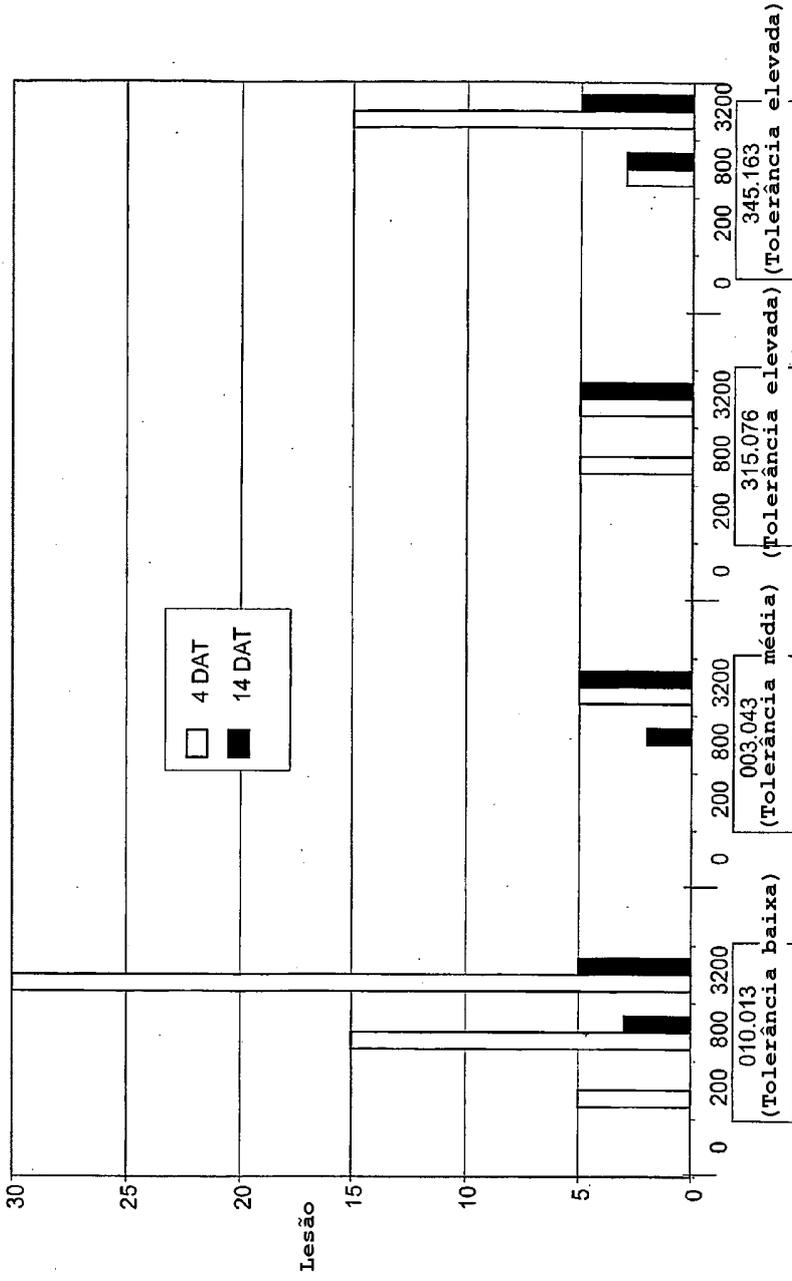


Fig. 9A

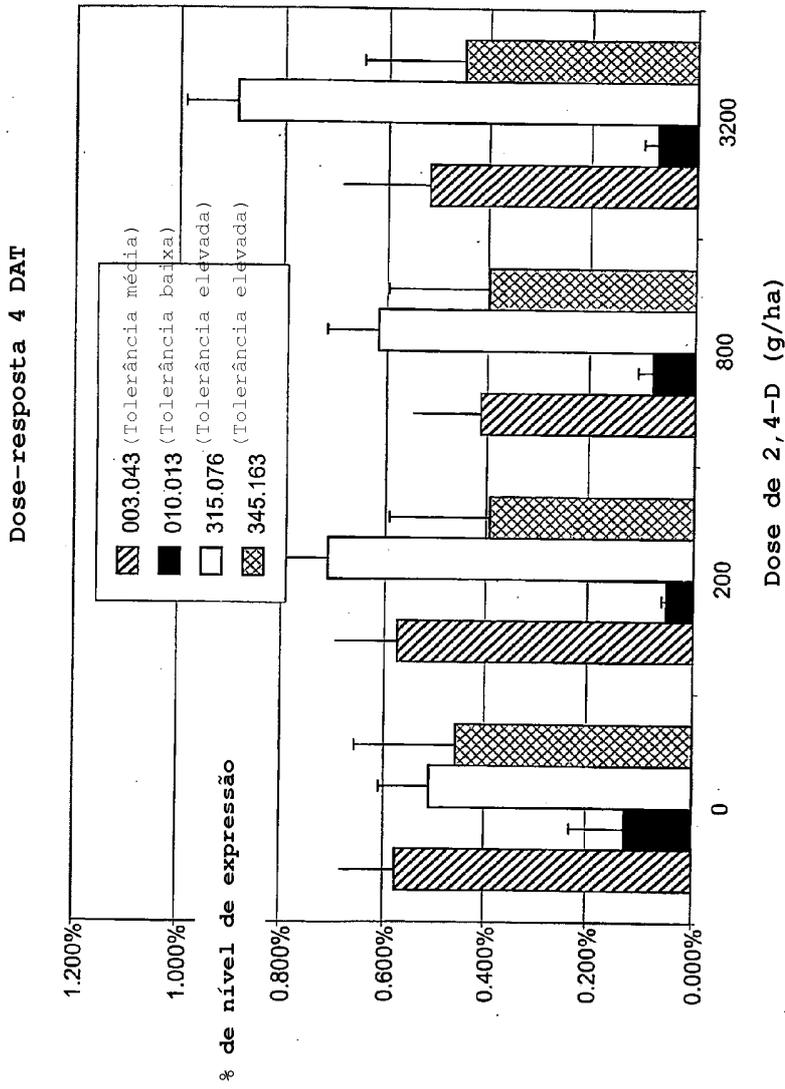


Fig. 9B

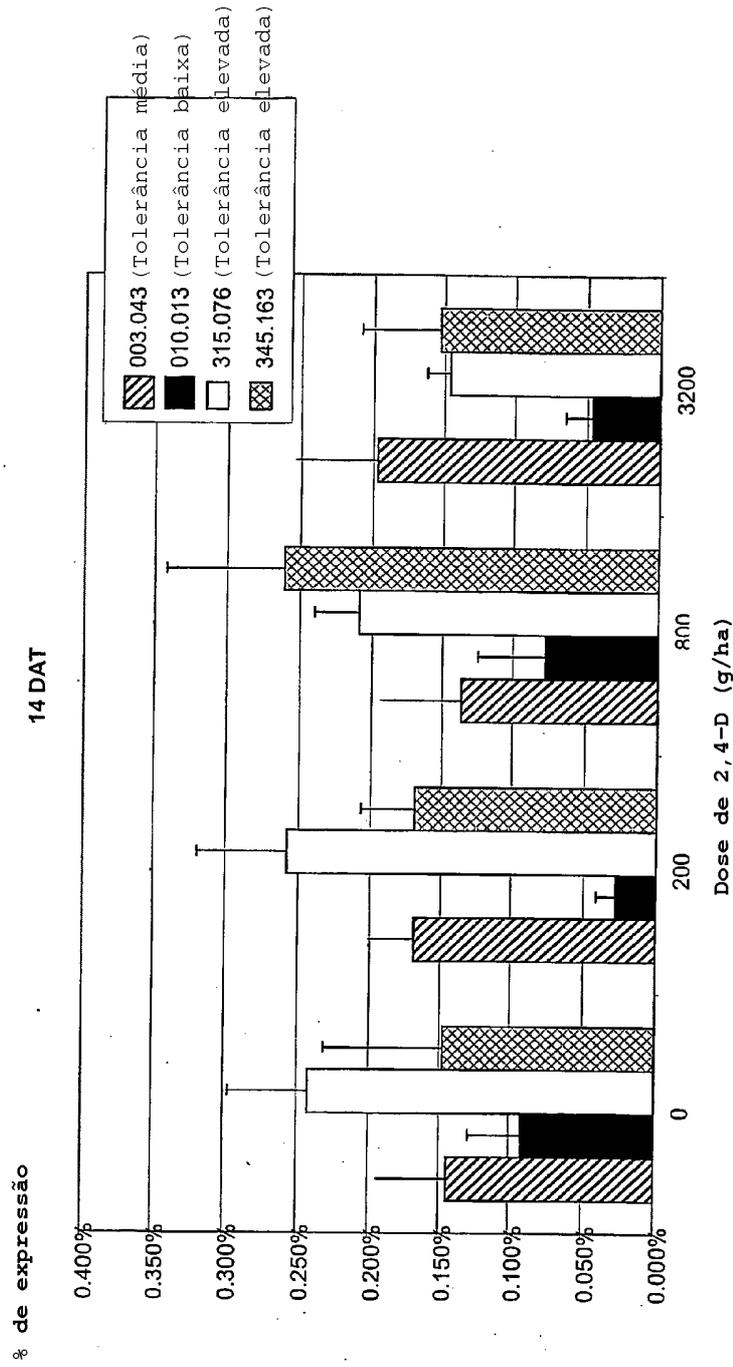


Fig. 9C

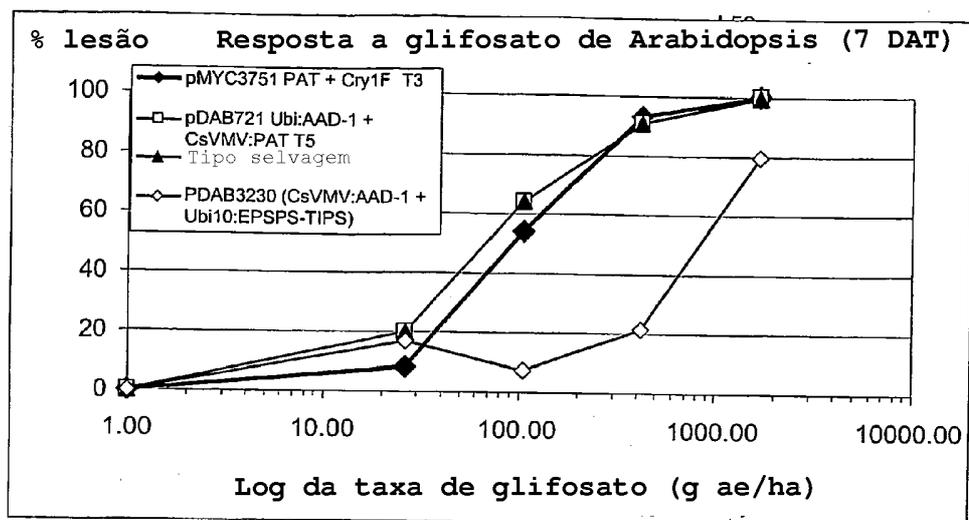


Fig. 10

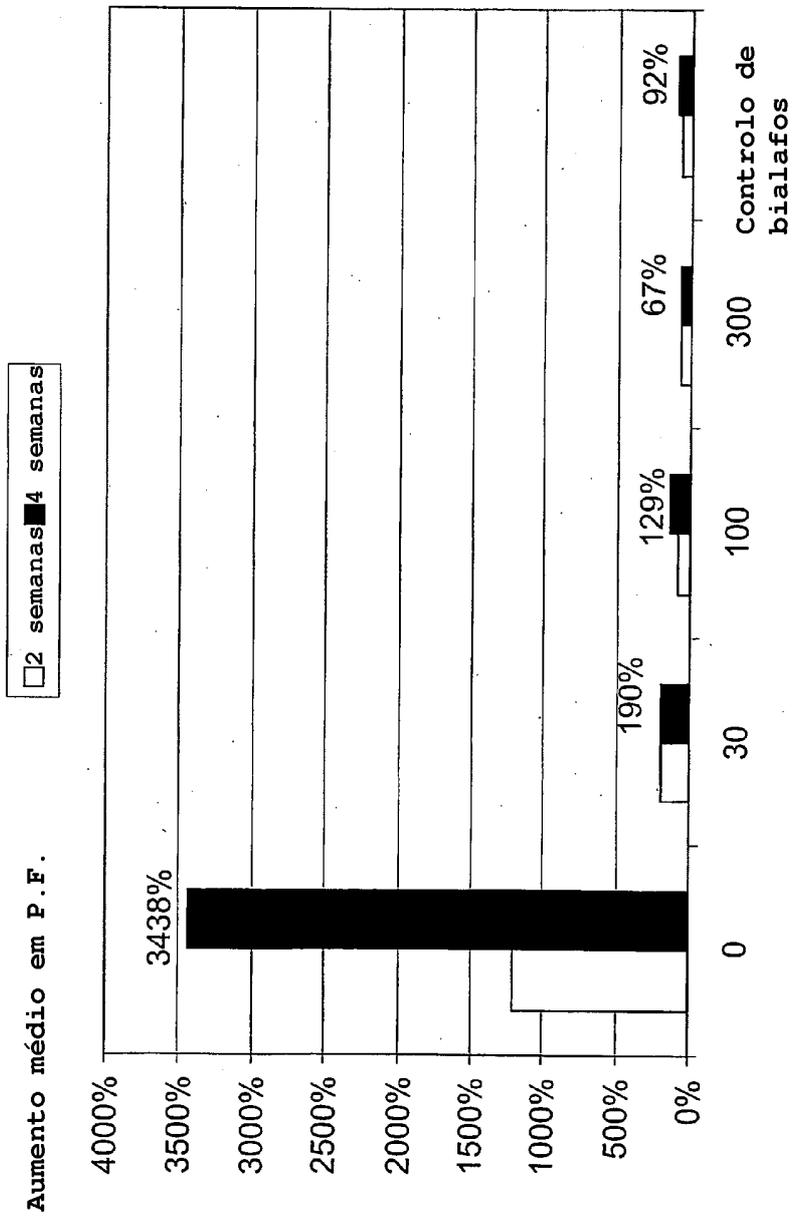


Fig. 11

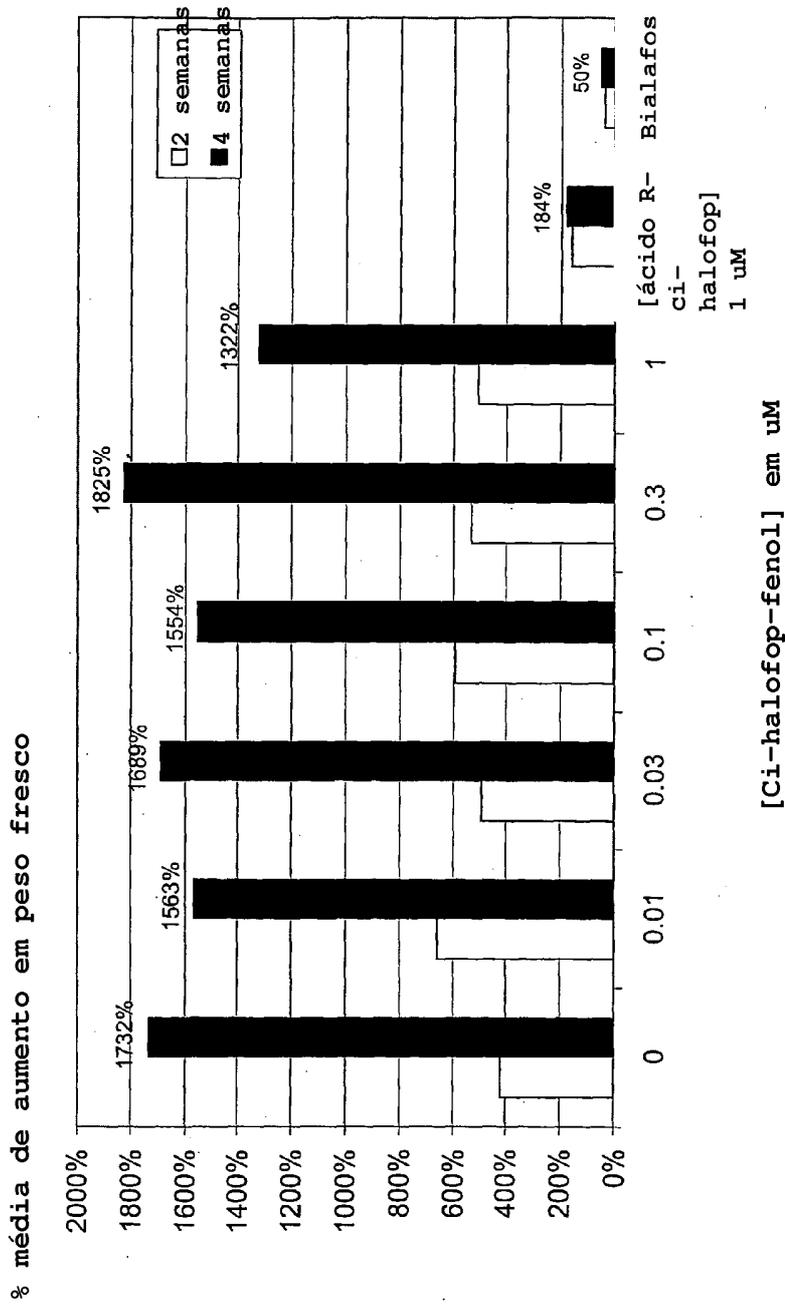
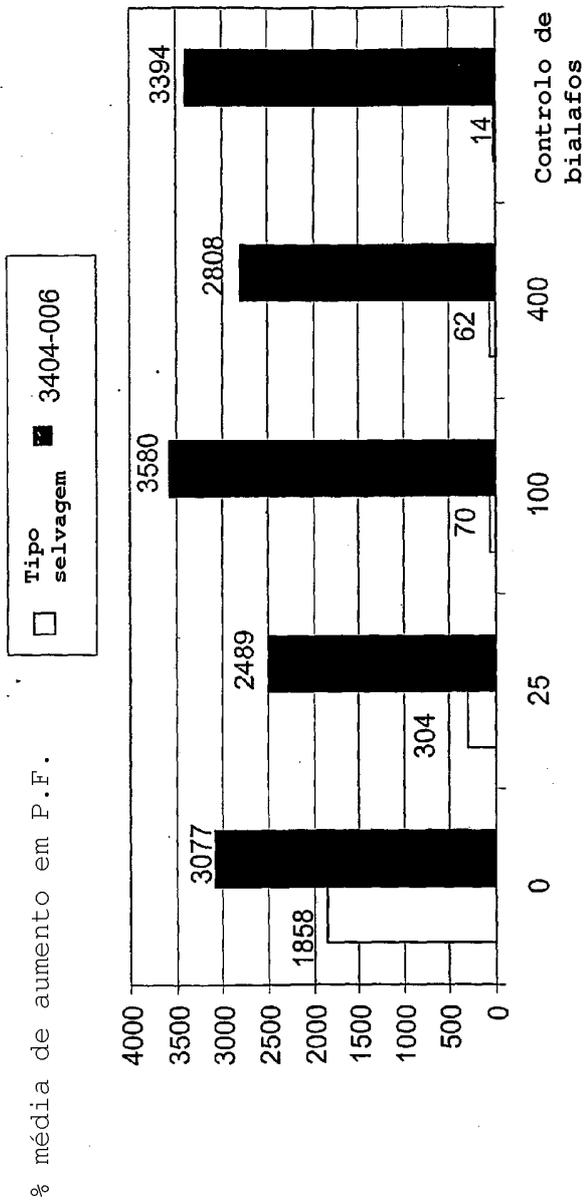


Fig. 12



[Haloxifop] em Gallannt*Super em nM

Fig. 13

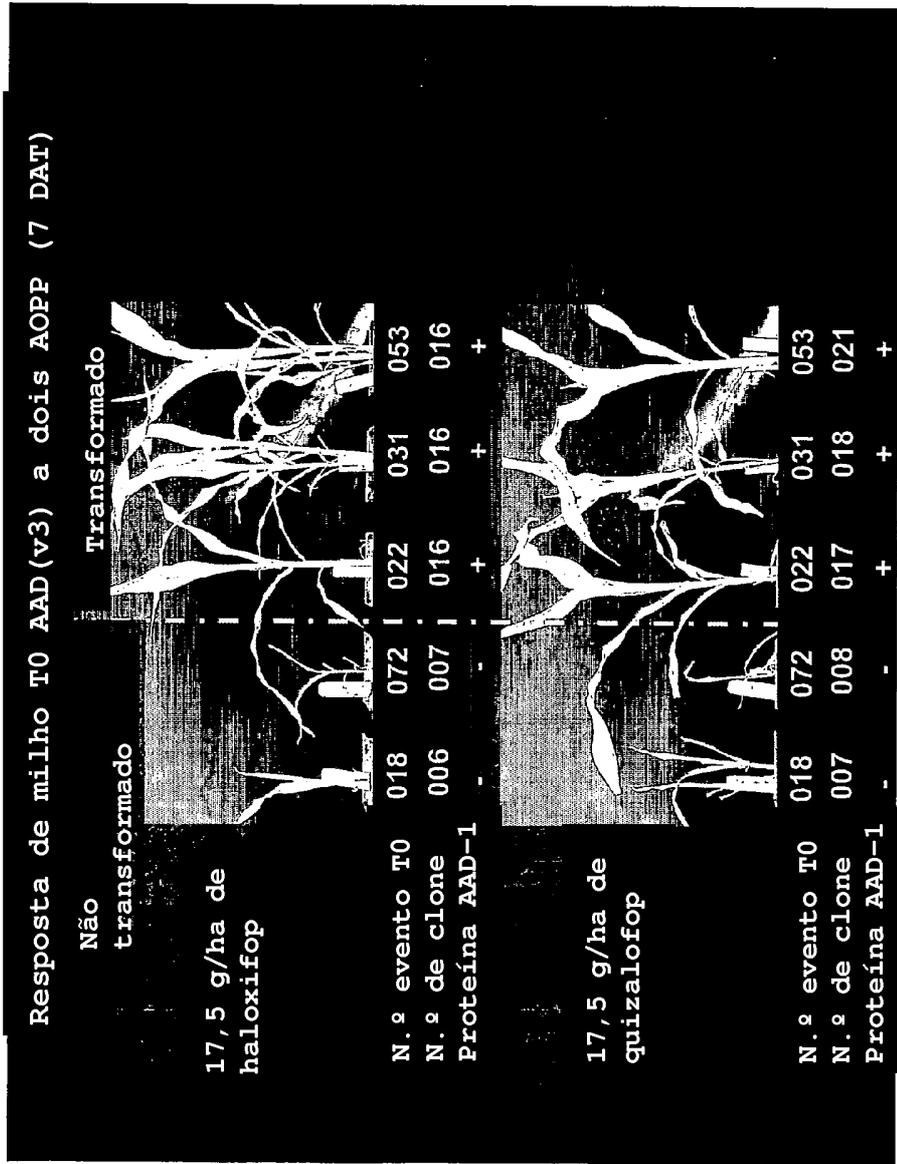


Fig. 14

Expressão (% TSP) Expressão de AAD-1 (v3) em folhas de milho 30 DAT

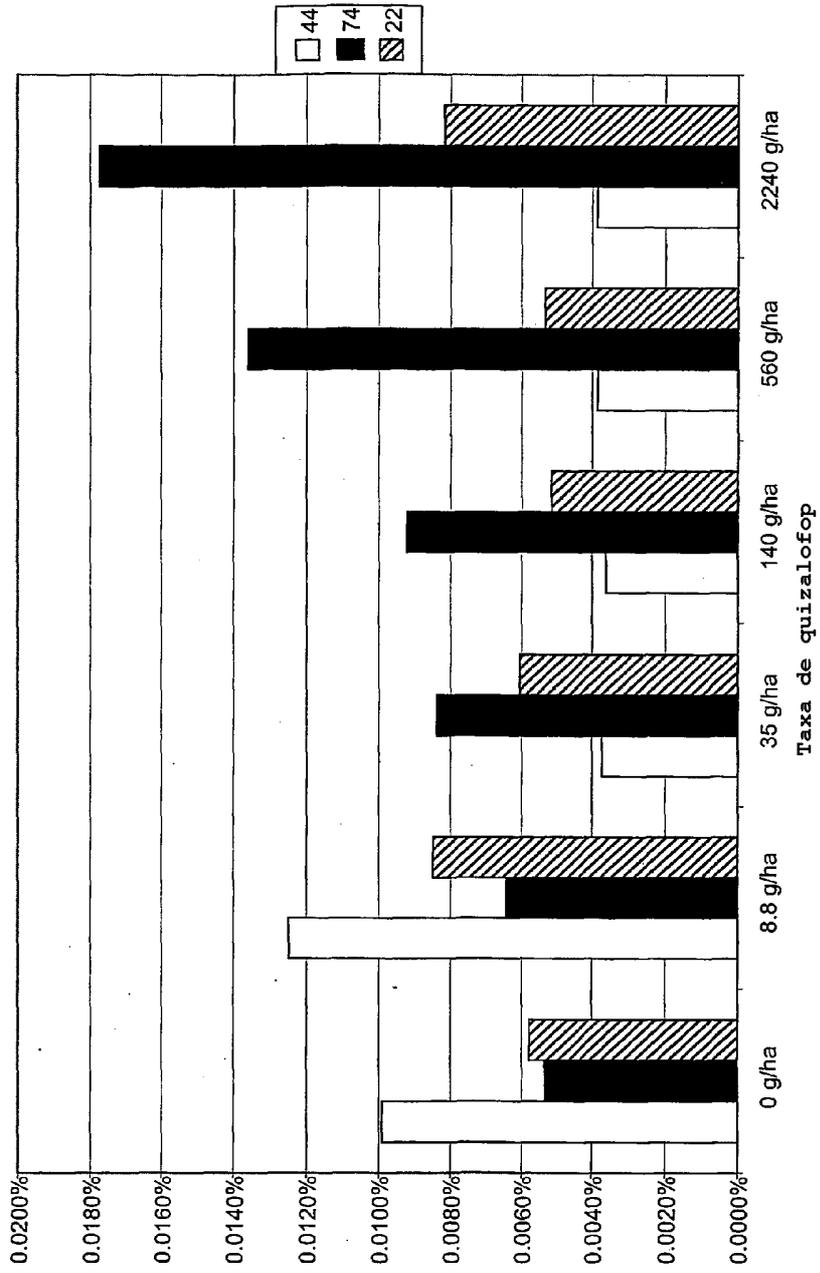


Fig. 15

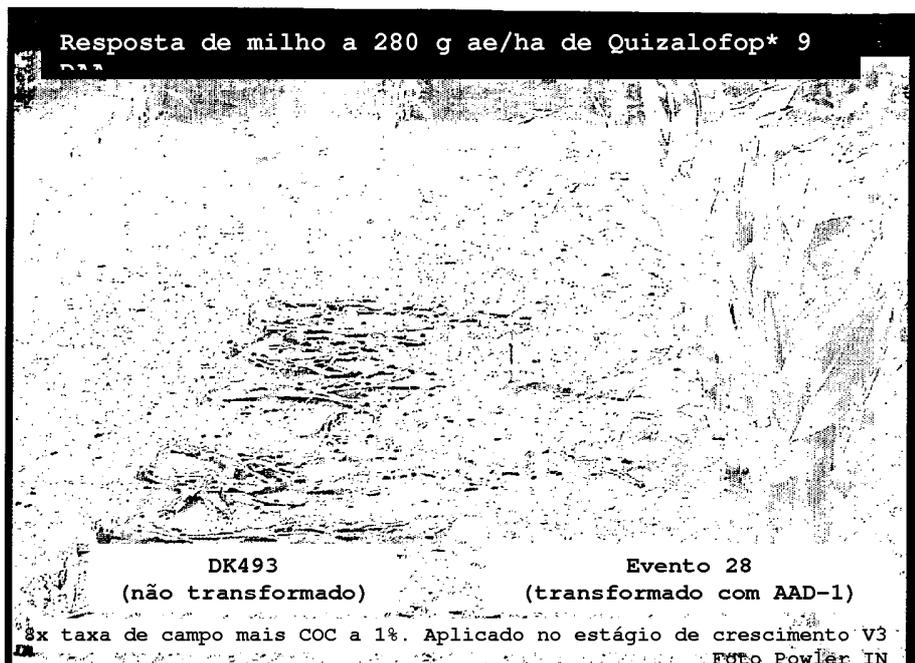


Fig. 16

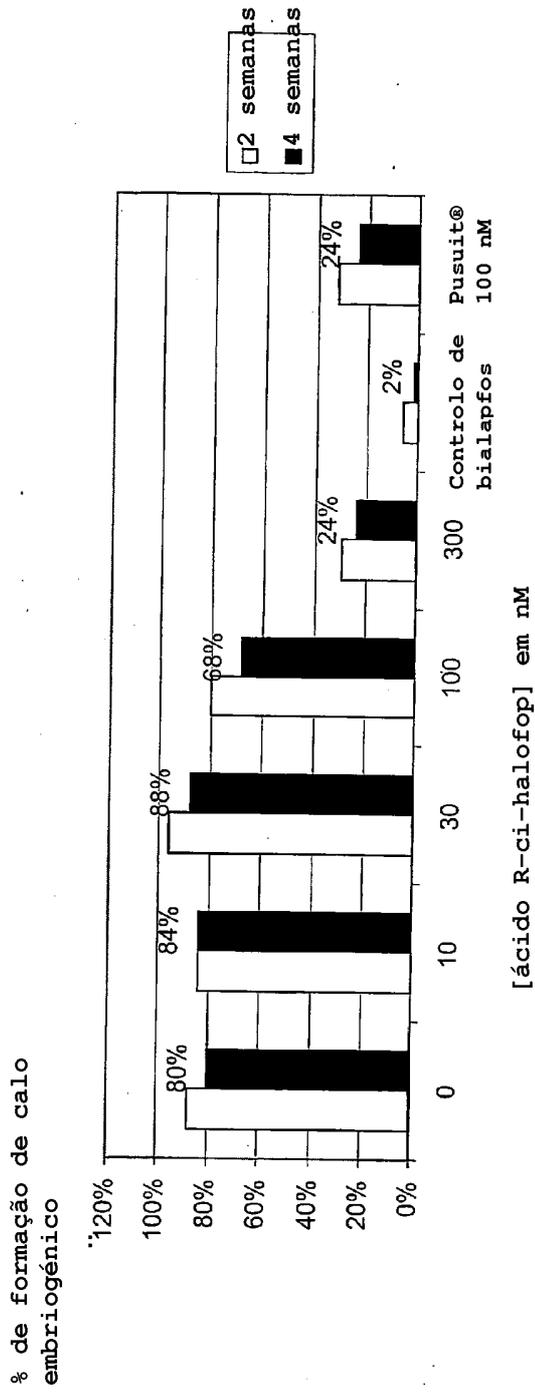
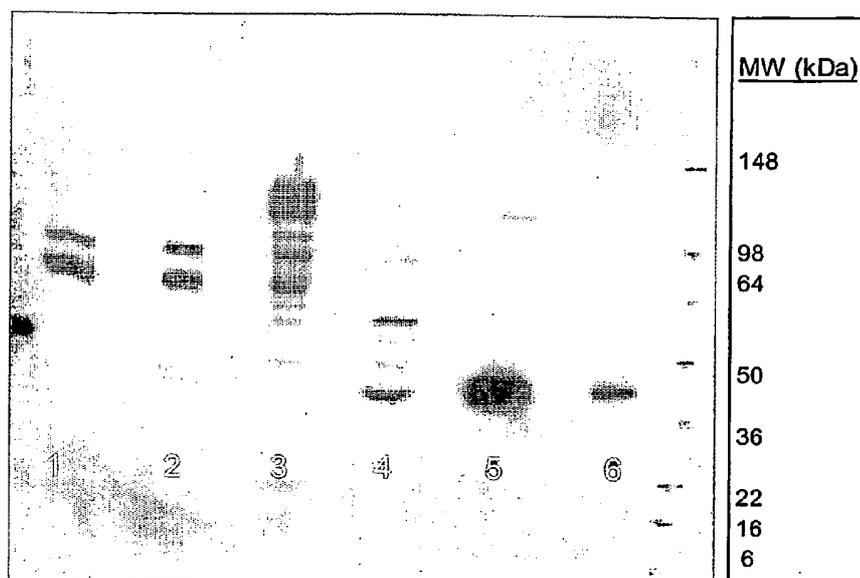


Fig. 17



Transferência "Western"

Pista	
1	Calos n.º1
2	Calos n.º2
3	Negativo
4	Milho AAD1
5	Padrão 5 ug/mL
6	Padrão 0,5 ug/mL

Fig. 18

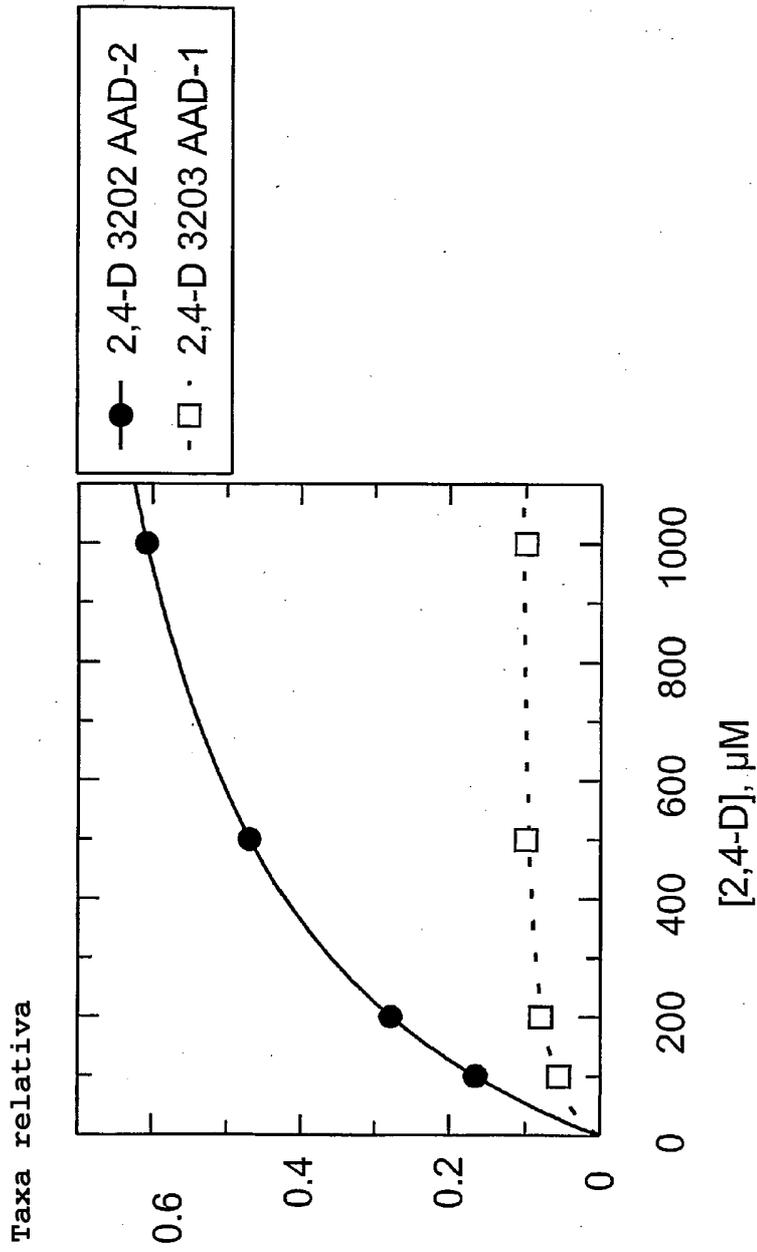


Fig. 19

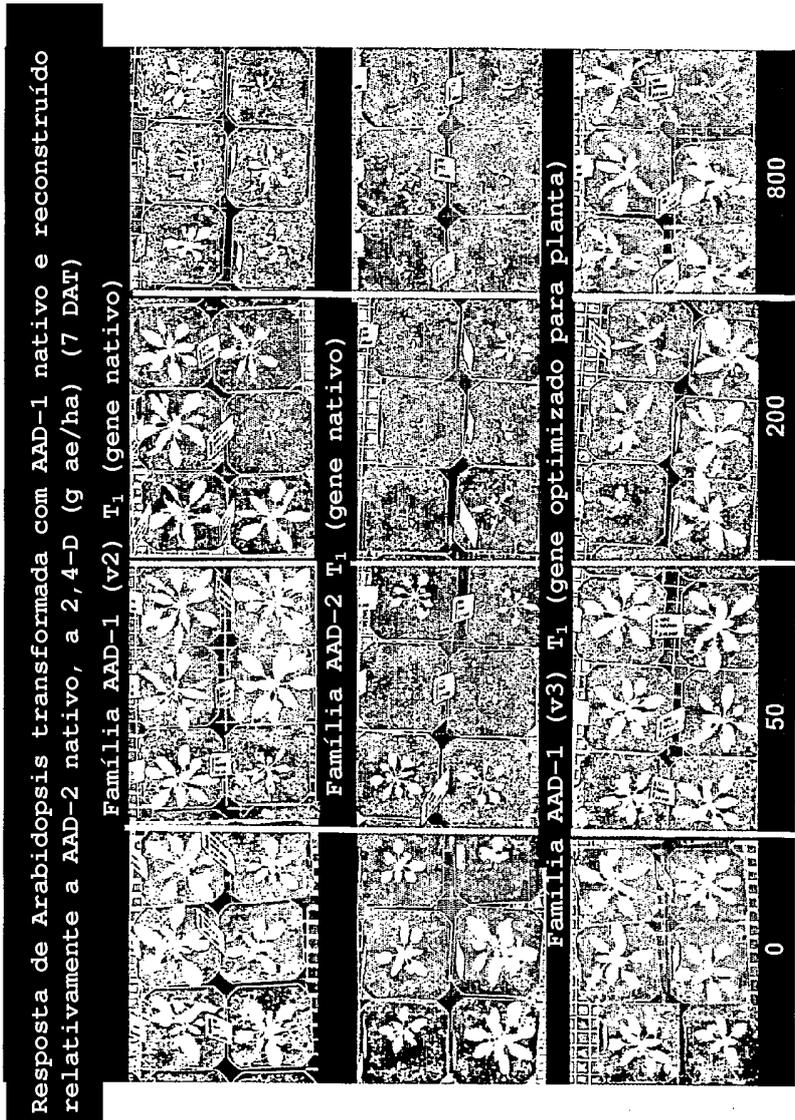


Fig. 20

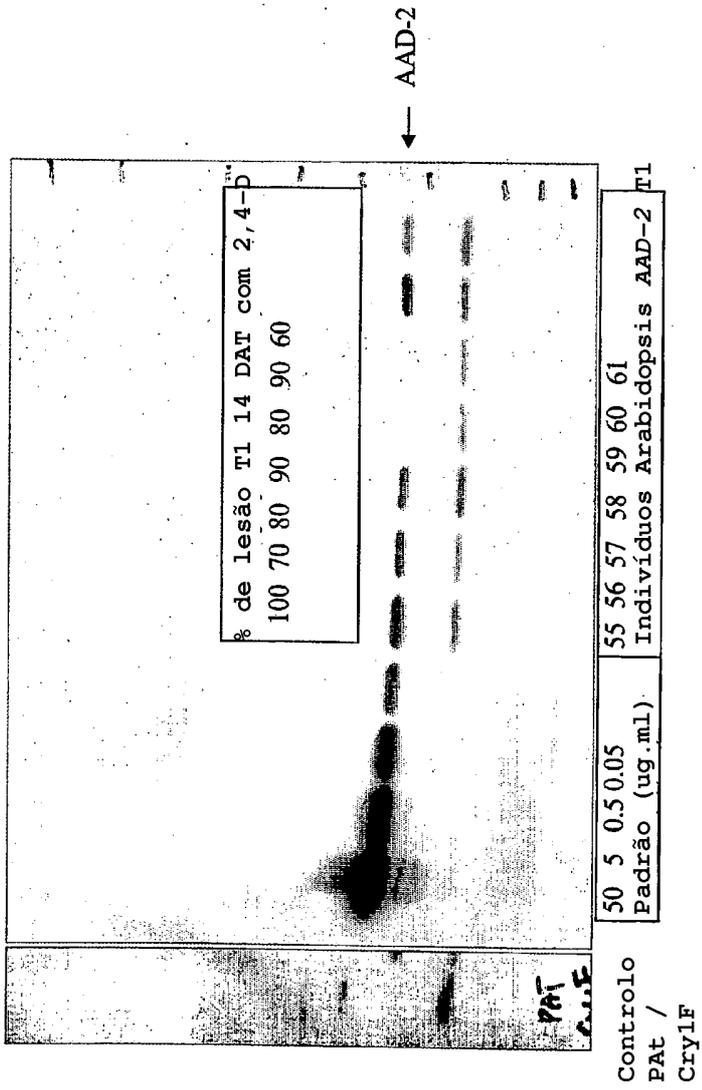


Fig. 21

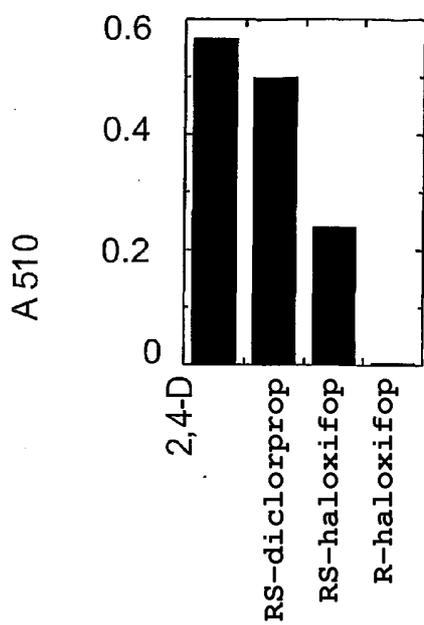


Fig. 22