



(11) *Número de Publicação:* PT 698106 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12N015/82 A C12N015/54 B
C12N001/21 B C12N005/10 B
A01H005/00 B

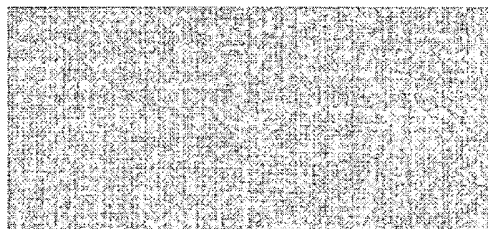
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.05.11	(73) <i>Titular(es):</i> AVENTIS CROPS SCIENCE N.V. JOZEF PLATEAU STRAAT 22 9000 GENT BE
(30) <i>Prioridade:</i> 1993.05.13 EP 93401237	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1996.02.28	(72) <i>Inventor(es):</i> MARCUS CORNELISSEN BE ARLETTE REYNAERTS BE VÉRONIQUE GOSSELE BE ROEL VAN AARSSSEN BE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.08.01	(74) <i>Mandatário(s):</i> MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MARCADOR GENÉTICO

(57) *Resumo:*

MARCADOR GENÉTICO



DESCRIÇÃO

MARCADOR GENÉTICO

Esta invenção está relacionada com um marcador genético quimérico seleccionável que compreende: um promotor que pode ser expresso em plantas, ADN que codifica uma aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase (a "AAC(6')") e uma formação 3'-terminal e região de poliadenilação activa em células vegetais.

Esta invenção está ainda relacionada com um processo para seleccionar ou identificar células vegetais transformadas, através da expressão do marcador genético quimérico que codifica a AAC(6'), nas células vegetais. O marcador genético quimérico confere às células vegetais resistência a concentrações normalmente letais ou supressoras do crescimento de um antibiótico que é eficientemente desintoxicado pela AAC(6') nas células.

Esta invenção está também relacionada com uma célula vegetal transformada, de uma forma estável, com o marcador genético quimérico que codifica a AAC(6') e com uma planta regenerada a partir desta célula vegetal.

Antecedentes da invenção

A tecnologia da engenharia genética de plantas tem feito progressos significativos durante a última década. Tornou-se possível introduzir, de uma forma estável, genes estranhos em plantas. Isto tem proporcionado oportunidades emocionantes para a agricultura moderna.

A utilização de marcadores genéticos quiméricos seleccionáveis na transformação de células vegetais tem simplificado consideravelmente a selecção de células vegetais transformadas. Por exemplo, através da expressão de um marcador genético deste tipo, células vegetais transformadas podem tornar-se resistentes a antibióticos que são citotóxicos ou supressores do crescimento para células não transformadas. Um marcador genético quimérico habitualmente usado contém a região que codifica a neomicina-fosfotransferase-II ou nptII (Bevan et al. (1983) Nature 304, 184-187; Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803-4807). O gene nptII confere resistência a canamicina,

neomicina e antibióticos G-418 em células vegetais que expressam o gene (Reynaerts et al. (1987) *Plant Mol. Biol. Manual*, Gelvin, S.B. & Schilperoort, R.A. (eds), Kluwer, Dordrecht, sec. A9, pp. 1-16).

Os marcadores genéticos quiméricos contêm normalmente: um promotor que pode ser expresso em plantas (com uma região 5' não traduzida); ADN (tal como o gene *nptII*) que codifica um marcador seleccionável; e uma formação 3'-terminal e região de poliadenilação activa em plantas. Embora a versatilidade do gene *nptII* tenha sido confirmada em marcadores genéticos quiméricos utilizados em vários sistemas vegetais ao longo dos anos, têm surgido limitações à sua utilização que têm obrigado ao desenvolvimento de genes alternativos de resistência a antibióticos para uso nestes marcadores genéticos quiméricos seleccionáveis (Hayford et al. (1988) *Plant Physiol.* **86**, 1216). Além disso, em muitas situações, tem sido necessário um segundo gene de resistência a antibióticos complementar para introdução em plantas que já haviam sido transformadas com um gene de resistência a antibióticos. Estes genes de resistência a antibióticos alternativos já existem, mas exigem frequentemente o uso de substratos muito tóxicos e/ou não permitem uma selecção eficiente em todas as espécies de plantas. Claro que para espécies que são rotineiramente reproduzíveis de uma forma vegetativa, como seja a batata, são necessários genes de resistência a antibióticos que codificam diferentes marcadores seleccionáveis, com diferentes substratos específicos, quando é necessário alterar genes distintos, em diferentes momentos, numa planta.

Entre os genes de resistência a antibióticos conhecidos encontram-se aqueles que codificam enzimas que acetilam antibióticos aminoglicosidos (AAC), entre as quais foram caracterizados quatro tipos (com base na posição do grupo amino modificado dos aminoglicosidos derivados de 2-desoxiestreptamina): AAC(1), AAC(2'), AAC(3) e AAC(6'). Consultar Shaw et al. (1989) *Antimicrob. Agents & Chemotherapy* **33**, 2052-2062. A análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) demonstrou as diferenças entre os produtos acetilados destes quatro tipos de enzimas, e os perfis de resistência a aminoglicosidos podem ser usados para identificar a presença de cada um destes tipos de enzimas numa estirpe hospedeira (Shaw et al. (1989) *supra*).

A Publicação de Patente Europeia ("EP") 0 289 478 (Rogers et al. (1988)), Hayford et al. (1988) *supra* e Carrer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* **17**, 301-303 descrevem a selecção em gentamicina de plantas transformadas com um gene que codifica uma aminoglicosido-3-

N-acetiltransferase (o "gene aac(3)"). Constatou-se que o gene aac(3)-IV conferia resistência a canamicina (em Petúnia), mas o nível de resistência era, no máximo, apenas suficiente para uma selecção marginal (Hayford et al. (1988) supra). Estas publicações também descrevem a supertransformação do tabaco, previamente transformado com o gene npII, com o gene aac(3), através de selecção em meio contendo gentamicina. A EP 0 289 478 também descreve a utilização de gentamicina como substrato na transformação de petúnia, rebentos de soja, sementes de colza e alfafa com o gene aac(3). Carrer et al. (1991) supra também descrevem a transformação de plantas de tabaco com um gene aac(3)-I, que apenas confere resistência a gentamicina, na qual as plantas resistentes a gentamicina retêm a sua sensibilidade a canamicina. De acordo com Carrer et al. (1991) supra, nalguns casos poderá ser mais vantajoso utilizar um marcador genético seleccionável com uma especificidade restrita de substratos.

Os genes que codificam a AAC(6') (os "genes aac(6')") constituem uma classe de genes diferentes, mas relacionados que acetilam o grupo 6'-amino de vários antibióticos aminoglicosidos. Vários genes aac(6') bacterianos foram clonados e sequenciados. De acordo com Davis (1986) in Antibiotics in Laboratory Medicine, pp. 474-489, (ed.) Lorian V., Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland; e Phillips & Shannon (1984) British Med. Bull. 40, 28-35, a AAC(6') acetila a tobramicina, a canamicina, a amicacina, a neomicina, a gentamicina C_{1A} e C₂, a sissomicina e a netilmicina, embora com eficiências variáveis dependendo do tipo de AAC(6'). Foram caracterizados dois subtipos de genes aac(6') através dos seus perfis de resistência a aminoglicosidos: os genes aac(6')-I e os genes aac(6')-II; a primeira subclasse compreende os genes aac(6')-IV e -4, e a última subclasse compreende o gene aac(6')-III (Shaw et al. (1989) supra). Contudo, também foram efectuadas outras classificações destes genes.

Também se constatou que outra acetiltransferase, a fosfinotricina-acetiltransferase, é capaz de conferir um fenótipo seleccionável (isto é, resistência a um herbicida) em células vegetais (De Block et al. (1987) EMBO J. 6, 2513-2518).

A EP 0 248 207 (Wohlleben et al., 1987) descreve um gene de resistência a gentamicina que é activo em Streptomyces e que pode ser obtido a partir de uma estirpe de S. ghanaensis por digestão total com BgIII.

A Publicação de Patente Francesa 2 601 965 (Courvalin, 1988) descreve um gene bifuncional que codifica actividades de AAC(6') e APH(2''), a clonagem e sequenciação deste gene e o uso de partes do gene como uma sonda de ADN para detectar o desenvolvimento de resistência a antibióticos em culturas bacterianas.

Sumário da invenção

De acordo com esta invenção, é disponibilizado um marcador genético quimérico seleccionável (o "gene aac(6') quimérico") que compreende os seguintes elementos, ligados de forma operacional, no mesmo locus genético: um promotor que pode ser expresso em plantas; uma sequência de ADN que codifica uma AAC(6') (o "ADN aac(6')"), particularmente um ADN aac(6') com a sequência da SEQ ID N.º 1, sob o controlo do promotor; e uma formação 3'-terminal e região de poliadenilação activa em células vegetais.

Também de acordo com esta invenção, é disponibilizado um método para seleccionar ou identificar células vegetais transformadas por: transformação das células com o gene aac(6') quimérico, seguida de contacto das células com concentrações de um antibiótico aminoglicosido que são letais ou supressoras do crescimento para células vegetais não transformadas.

Adicionalmente, de acordo com a invenção, é disponibilizada uma célula vegetal transformada, de forma estável, com o gene aac(6') quimérico, uma cultura de células vegetais e uma planta regenerada a partir desta célula vegetal, um vector de transformação para plantas, um plasmídeo e uma estirpe de Agrobacterium contendo o gene aac(6') quimérico.

Descrição detalhada da invenção

O termo "ADN aac(6')", tal como aqui utilizado, designa uma sequência codificante de ADN codificando uma proteína (uma "AAC(6')") que catalisa a acetilação do grupo 6'-amino de antibióticos aminoglicosidos. Este termo inclui uma sequência de ADN parcial ou totalmente sintética, assim como uma sequência de ADN natural que codifica uma AAC(6'). Os ADNs aac(6') preferidos, de acordo com esta invenção, incluem o ADN da SEQ ID N.º 1 e ADNs substancialmente semelhantes, tais como os ADNs aac(6')

descritos por Nobuta et al. (1988) J. Bacteriol. 170, 3769; Tolmaski (1990) Plasmid 24, 218-226; e Tran van Nhieu e Collatz (1987) J. Bacteriol. 169, 5708. Outros ADNs aac(6') desta invenção incluem aqueles descritos por Davies e Smith (1978) Ann. Rev. Microbiol. 32, 469-518; Morohoshi et al. (1984) J. Antibiotics 37, 1687-1691; Tenover et al. (1988) J. Bacteriol. 170, 471; Ferretti et al. (1986) J. Bacteriol. 167, 631; e Shaw et al. (1989) Antimicrob. Agents and Chemotherapy 33, 2052.

O termo "gene aac(6') quimérico", tal como aqui utilizado, designa um marcador genético quimérico seleccionável que compreende o ADN aac(6'), ligado de forma operacional a um promotor que pode ser expresso em plantas (incluindo uma região 5' não traduzida) e a uma formação 3'-terminal e região de poliadenilação activa em plantas. O ADN aac(6') também pode ser expresso como uma proteína de fusão numa fusão genética quimérica com outro ADN transformante, de forma a realçar a selecção do genótipo desejado. A construção desta fusão genética quimérica pode ser efectuada de acordo com técnicas derivadas de métodos habitualmente utilizados para construir genes quiméricos que compreendem marcadores conhecidos.

O termo "marcador genético seleccionável", tal como aqui utilizado, designa uma sequência de ADN cuja expressão, numa célula vegetal, confere um fenótipo seleccionável (por exemplo, resistência a antibióticos) à célula vegetal.

O termo "modificações neutras em termos da tradução", tal como aqui utilizado, designa modificações de um gene ou de uma sequência de ADN que não afectam a sequência de aminoácidos codificada pelo gene ou sequência de ADN. Os exemplos preferidos destas modificações neutras em termos da tradução são alterações, por meio de substituições de nucleótidos, de códons noutros códons que codificam os mesmos aminoácidos.

O termo "substrato adequado" ou "antibiótico substrato adequado", tal como aqui utilizado, é um antibiótico aminoglicosido (por exemplo, a canamicina) que é eficientemente modificado por AAC(6'), de forma que a expressão do ADN aac(6') numa célula vegetal confere resistência ao antibiótico na célula vegetal. Por este motivo, o termo "substrato de uma AAC(6')", tal como aqui utilizado, designa qualquer antibiótico aminoglicosido que pode ser modificado, isto é, acetilado, pelo produto do gene aac(6').

Um ADN aac(6') desta invenção pode ser facilmente isolado de bactérias através de procedimentos de rotina, após crescimento num substrato adequado contendo normalmente níveis inibitórios de um antibiótico aminoglicosido, como seja a canamicina; por exemplo, como descrito por Nobuta et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 3769. A actividade de AAC(6') pode ser analisada por métodos convencionais (Davies (1986) *supra*; Shaw et al. (1989) *supra*).

De preferência, um ADN aac(6') desta invenção é inserido no genoma de uma planta a jusante (isto é, 3') de, e sob o controlo de, um promotor que pode dirigir a expressão do gene em células vegetais. Os promotores preferidos incluem, mas não se limitam ao forte promotor constitutivo 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313, 810) ou ao promotor duplicado 35S (Kay et al. (1987) *Science* 236, 1299) do vírus do mosaico da couve-flor; os promotores 35S têm sido obtidos a partir de diferentes isolados (Hull & Howell (1987) *Virology* 86, 482-493). Outros promotores preferidos incluem o promotor TR1' e o promotor TR2' (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3, 2723). Também preferidos são os promotores monocotiledóneos, como sejam os promotores descritos em EPO 0 342 926 ou EP 0 459 643. Em alternativa, pode utilizar-se um promotor que não é constitutivo, mas sim específico para um ou mais tecidos ou órgãos vegetais. Por exemplo, o ADN aac(6') pode ser expresso de forma selectiva nos tecidos verdes de uma planta, colocando o ADN sob o controlo de um promotor ligeiramente induzível, como seja o promotor do gene da subunidade pequena da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase, tal como descrito em EP 0 193 259. Outra alternativa consiste em usar um promotor cuja expressão é induzível pela temperatura ou por factores químicos, ou um promotor que é expresso, preferencial ou selectivamente, no período de tempo ou na fase de desenvolvimento em que as células são seleccionadas, como seja um promotor específico para a formação de calos, os quais têm sido anteriormente utilizados com outros marcadores. Em qualquer caso, é evidente que um promotor a utilizar nesta invenção deve pelo menos permitir uma expressão suficiente do ADN aac(6') em células vegetais para conferir resistência a antibióticos nas células vegetais.

É preferido que o ADN aac(6') seja inserido a montante (isto é, 5') de sinais de regulação da transcrição 3' adequados (isto é, sinais de formação 3'-terminal e de poliadenilação do transcrito). Os sinais de regulação da transcrição 3' preferidos incluem aqueles do gene da chalcona-sintase (Sommer & Saedler (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202, 429), do vírus do mosaico da couve-flor (Mogen et al. (1990) *The Plant Cell* 2, 1261), do gene da octopina-

sintase (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3, 835) ou do gene 7 do T-ADN (Velten & Schell (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6981).

De acordo com esta invenção, pode inserir-se, de forma estável, todo ou parte de um ADN aac(6') desta invenção, de uma maneira convencional, no genoma nuclear de uma célula vegetal, e a célula vegetal assim transformada pode ser utilizada para produzir uma planta transgénica que apresenta resistência a antibióticos aminoglicosidos. A este respeito, pode usar-se um plasmídeo-Ti desactivado contendo o gene aac(6') quimérico em Agrobacterium (por exemplo, A. tumefaciens) para transformar uma célula vegetal, usando os procedimentos descritos, por exemplo, em EP 0 116 718 e EP 0 270 822, na Publicação PCT WO 84/02913, em EP 0 242 246, em De Block (1988) Theor. Appl. Genet. 76, 767-774, e em Gould et al. (1991) Plant Physiol. 95, 426 (que são aqui incorporadas por meio de referência). Os vectores plasmídicos-Ti preferidos contêm o gene aac(6') quimérico entre as sequências de fronteira, ou pelo menos localizado para a esquerda da sequência de fronteira direita, do T-ADN do plasmídeo-Ti. Obviamente, podem utilizar-se outros tipos de vectores para transformar a célula vegetal, usando procedimentos como a transferência directa de genes (como descrito, por exemplo, em EP 0 233 247), a transformação mediada por pólen (como descrito, por exemplo, em EP 0 270 356, Publicação PCT WO 85/01856 e Patente U.S. 4,684,611), a transformação mediada pelo ARN de vírus de plantas (como descrito, por exemplo, em EP 0 067 553 e Patente U.S. 4,407,956), a transformação mediada por liposomas (como descrito, por exemplo, na Patente U.S. 4,536,475) e outros métodos tal como os métodos para transformar monocotiledónias (por exemplo, os cereais principais que incluem o milho, o arroz, o trigo, a cevada e o centeio) como descritos na Publicação PCT WO 92/09696. No caso da planta a transformar ser o milho, também se podem utilizar outros métodos recentemente desenvolvidos como seja, por exemplo, o método descrito para certas linhas de milho por Fromm et al. (1990) Bio/Tech. 8, 833; Gordon-Kamm et al. (1990) The Plant Cell 2, 603; e Gould et al. (1991) supra. No caso da planta a transformar ser o arroz, também se podem utilizar outros métodos recentemente desenvolvidos como sejam, por exemplo, os métodos descritos por Shimamoto et al. (1989) Nature 338, 274; Datta et al. (1990) Bio/Tech. 8, 736; e Hayashimoto et al. (1990) Plant Physiol. 93, 857.

De forma a melhorar a expressão numa planta do gene aac(6') quimérico desta invenção, pode modificar-se o ADN aac(6'), por exemplo, alterando o emprego natural dos seus codões para formar um ADN aac(6') artificial equivalente. Estas modificações podem

incluir a introdução de intrões funcionais e/ou de modificações neutras em termos da tradução na sequência de ADN aac(6'), de forma a eliminar sequências de ADN prejudiciais que estão presentes neste ADN bacteriano, tal como descrito no Pedido de Patente PCT PCT/EP92/02547. Isto pode ser feito directamente, por modificação (de uma maneira neutra em termos da tradução) dessas sequências de ADN prejudiciais, inibindo a expressão nas células vegetais, ou indirectamente, por adaptação do emprego dos codões do ADN aac(6') para aquele preferido pela planta; por exemplo, como descrito por Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 477. Adicionalmente, para conseguir uma expressão suficiente em plantas monocotiledónias como o milho, pode adicionar-se um intrão de monocotiledónia, por exemplo o intrão do gene adh do milho, ligado de forma eficiente ao gene aac(6') quimérico (Koziel et al. (1993) Bio/Tech. 11, 194-200).

Uma planta transformada desta invenção, regenerada a partir de uma célula vegetal transformada com o gene aac(6') quimérico, apresenta resistência a antibióticos substratos adequados em virtude da produção de actividade de AAC(6') nas suas células vegetais. Esta planta pode ser utilizada num esquema de reprodução convencional para produzir mais plantas transformadas com as mesmas características de resistência a antibióticos aminoglicosidos ou para introduzir o gene aac(6') quimérico noutras variedades da mesma espécie de planta ou noutras espécies de plantas relacionadas, por meio de técnicas de reprodução padrão. As sementes, que são obtidas a partir das plantas transformadas, contêm o gene aac(6') quimérico como uma inserção genómica estável.

Uma vez que o espectro de antibióticos que podem ser quimicamente modificados por expressão de um ADN aac(6') desta invenção é diferente daquele da região codificante nptII, o ADN aac(6') pode ser utilizado com a região codificante nptII em diferentes marcadores genéticos quiméricos seleccionáveis, quando se querem introduzir dois genes estranhos diferentes numa planta, estando cada gene estranho associado ao seu próprio marcador genético quimérico. Quando se introduzem múltiplos marcadores genéticos quiméricos numa planta, poderá ser vantajoso utilizar um gene aac(6') quimérico conferindo apenas resistência a um grupo limitado de antibióticos aminoglicosidos (Carrer et al. (1991) supra). Contudo, se se utilizar apenas um marcador genético quimérico, é preferido usar um gene aac(6') quimérico com canamicina como substrato adequado para as células vegetais. A este respeito, o ensaio enzimático para detectar actividade de

acetiltransferase é muitas vezes mais rápido e mais conveniente de utilizar que o ensaio de fosfotransferase usado para detectar actividade relacionada com npII.

Para testar a transformação com êxito de plantas com um ADN aac(6') estão disponíveis diferentes métodos. Por exemplo, a resistência a antibióticos pode ser verificada num teste de indução de calos ou num ensaio de aplicação de "spots"; a presença e a actividade de AAC(6') também pode ser analisada através de um ensaio enzimático; o "Western blotting" pode proporcionar um teste imunológico fácil, mas é menos sensível; e a resistência a canamicina pode ser seguida na descendência de plantas transgênicas através do crescimento de sementes em meios que contêm canamicina.

Os exemplos que se seguem ilustram a invenção. Excepto se referido de outra forma nos exemplos, todos os procedimentos para produzir e manipular o ADN recombinante são efectuados segundo os procedimentos normalizados descritos em Sambrook et al., Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989) ou em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology vols. 1 and 2, Current Protocols, USA (1994).

Listagem das Sequências

- A SEQ ID N.º 1 mostra: i) a sequência de ADN de um ADN aac(6') proveniente de um plasmídeo de Shigella e ii) a correspondente sequência de aminoácidos codificada pelo ADN aac(6').
- A SEQ ID N.º 2 mostra: a sequência de aminoácidos da proteína AAC(6').
- A SEQ ID N.º 3 mostra: a sequência nucleotídica do iniciador de PCR "RVA61".
- A SEQ ID N.º 4 mostra: a sequência nucleotídica do iniciador de PCR "OFD15".
- A SEQ ID N.º 5 mostra: o plasmídeo "pTRVA3" contendo um gene aac(6') quimérico com um promotor 35S-2, o ADN aac(6') da SEQ ID N.º 1 e a formação 3'-terminal e região de poliadenilação do gene 7 do T-ADN.

A SEQ ID N.º 6 mostra: a sequência de aminoácidos da proteína AAC(6').

Exemplos

Exemplo 1. Clonagem de um ADN aac(6') e construção de um gene aac(6') quimérico

O ADN aac(6') foi obtido a partir do plasmídeo mini-Sa, pGV1106 (Leemans et al. (1982) Gene 19, 361-364). O fragmento PvuII/HindIII de 1,5 Kb do pGV1106; contendo o ADN aac(6'), foi ligado ao plasmídeo pGSC1600 linearizado com Scal (Cornelissen & Vandewiele (1989) Nucl. Acids Res. 17, 19-29), após tratamento com Klenow. O plasmídeo resultante, pFD1002A, foi utilizado como modelo para o PCR, utilizando os iniciadores RVA61 e OFD15 das SEQ ID N.ºs 3 e 4, respectivamente. O RVA61 é complementar da cadeia não codificante do ADN aac(6') e das suas sequências não traduzidas em pFD1002A. O fragmento de PCR aac(6') Sall/BamHI de pFD1002A foi ligado ao fragmento Sall/BamHI de 7,2 Kb do plasmídeo pGSJ290, que contém o gene quimérico, P35S-nptII-3'g7, para originar o plasmídeo pTRVA3 da SEQ ID N.º 5.

O pGSJ290 foi derivado de pGV825 (Deblaere et al. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 4777-4787), no qual se clonou uma construção genética P35S-nptII-3'g7 quimérica entre as repetições de fronteira do T-ADN. A extremidade 3' não traduzida do gene 7 do T-ADN (isto é, 3'g7) foi como descrita por Velten & Schell (1985) supra, o gene nptII foi de pKM109/90 (Reiss et al. (1984) EMBO J. 3, 3317-3322) e o promotor 35S CaMV (isto é, P35S) foi um promotor 35S-2 do vírus do mosaico da couve-flor, como descrito em EP 0 193 259 e em Gardner et al. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 2871-2888. A construção genética P35S-nptII-3'g7 quimérica foi clonada entre os locais HpaI e BglII do T-ADN, entre as repetições de fronteira direita e esquerda de pGV825.

Devido à introdução de um local de restrição BamHI a jusante do seu local de iniciação da tradução, a sequência de ADN aac(6') em pTRVA3, como ilustrado na SEQ ID N.º 5, continha os aminoácidos Asp e Pro nas posições 2 e 3, respectivamente, e continha o gene aac(6') quimérico, P35S-aac(6')-3'g7, incluindo o ADN aac(6') com a sequência da SEQ ID N.º 1.

Exemplo 2. Selecção de células de tabaco transformadas com aac(6') em canamicina.

Os plasmídeos pTRVA3 e pGSJ290 foram mobilizados de E. coli para a estirpe de A. tumefaciens C58C1-Rif^R (pGV2260; Deblaere et al. (1985) supra) através de um cruzamento triparental, como descrito por Deblaere et al. (1985) supra e em EP 0 193 259. As Agrobactérias resultantes foram seleccionadas em meio mínimo A (Miller (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Células Petit Havana SR1 comerciais de tabaco foram co-crescidas com estas Agrobactérias, e as células de tabaco transformadas foram seleccionadas usando a resistência a antibióticos, de acordo com De Block et al. (1984) EMBO J. 3, 1681-1689. As estirpes de Agrobacterium utilizadas para a infecção dos protoplastos de tabaco foram: C58C1-Rif^R (pGV2260) como controlo negativo; C58C1-Rif^R (pGV2260::pTRVA3) que contém o ADN aac(6'); e C58C1-Rif^R (pGV2260::pGSJ290) que contém o gene ntpII. Uma semana após a infecção, os protoplastos foram transferidos para meios selectivos contendo uma das seguintes concentrações distintas de sulfato de canamicina (Cm): 0-25-50-100, 6200 µg/ml.

Sete semanas após a infecção, começaram a crescer calos a partir das células co-crescidas com C58C1-Rif^R (pGV2260::pTRVA3) e C58C1-Rif^R (pGV2260::pGSJ290), para todas as concentrações de Cm. Os protoplastos infectados com pGV2260 (controlo negativo) só formaram calos em meio sem Cm. Após a transferência dos calos para meio de indução de rebentos contendo 200 µg/ml de Cm, formaram-se facilmente rebentos. A análise de Southern do ADN extraído de plantas de tabaco regeneradas e resistentes a canamicina confirmaram a integração estável do ADN aac(6').

Exemplo 3. Selecção de células de batata transformadas com aac(6') em canamicina.

Discos das folhas da variedade de batata Yesmina foram co-crescidos com as estirpes de Agrobacterium tumefaciens C58C1-Rif^R (pGV2260::pTRVA3) e C58C1-Rif^R (pGV2260::pGSJ290) que transportam os genes quiméricos do exemplo 2 contendo ou o ADN aac(6') ou o gene ntpII, como descrito por De Block (1988) supra. Os discos das folhas foram transferidos para meio de indução de calos contendo 50 µg/ml de sulfato de canamicina. Cerca de 30% dos discos das folhas que foram co-crescidos com

Agrobacterium C58C1-Rif^R (pGV2260::pGSJ290) produziram calos em desenvolvimento na presença de canamicina, enquanto cerca de 70% dos discos das folhas que foram co-crescidos com Agrobacterium C58C1-Rif^R (pGV2260::pTRVA3) produziram calos em desenvolvimento após crescimento durante 6 semanas em meio com canamicina. Após transferência dos calos transformados com aac(6') para meio de regeneração de rebentos, formaram-se facilmente rebentos. As plantas de batata regeneradas retêm o fenótipo de resistência a canamicina. A análise de Southern do ADN extraído das plantas de batata resistentes a canamicina e da sua descendência confirma a integração do ADN aac(6').

Exemplo 4. Ensaio de actividade enzimática em plantas transformadas com aac(6').

O calo e o tecido das folhas de tabaco do exemplo 2 contendo o gene aac(6') quimérico mostraram actividade de AAC(6') quando foram testados num ensaio de acetiltransferase, em cromatografia de camada fina (CCF), para canamicina. Utilizou-se o ensaio de acetiltransferase para determinar actividade de fosfotricina-acetiltransferase de acordo com De Block et al. (1987) EMBO J. 6, 2513-2518, com a excepção de se ter usado sulfato de canamicina em vez de fosfotricina como substrato, numa concentração que foi o dobro da concentração de fosfotricina utilizada por De Block et al. (conferir acima), e de se terem adicionado 2 µl de ¹⁴C-acetilcoenzima A em vez de uma mistura contendo a forma radioactiva e a forma não radioactiva da enzima. Após incubação durante 30 minutos a 37°C, a mistura reaccional foi colocada sob a forma de "spots" em placas de CCF, e os produtos de reacção foram separados por cromatografia em 1-propanol/NH₄OH (3/2). Extractos dos calos contendo o gene aac(6') quimérico catalisaram a acetilação da canamicina, ao passo que não se observou qualquer reacção com os extractos de calos de plantas SR1 não transformadas e com os calos expressando nptII. Também se verificou que extractos do tecido das folhas de plantas de tabaco regeneradas transformadas com aac(6') acetilam de forma eficiente a canamicina.

Escusado será dizer, esta invenção não está limitada às plantas de tabaco e de batata transformadas com o ADN aac(6'). Ela inclui qualquer planta, como seja o tomate, o algodão, as sementes de colza, a alfafa, o girassol, o milho, o arroz, os rebentos de soja, as Brássicas, a beterraba e outros vegetais, transformados com um ADN aac(6').

Nem está esta invenção limitada ao uso do gene *aac(6')* quimérico da SEQ ID N.º 5 ou ao ADN *aac(6')* da SEQ ID N.º 1 para transformar células vegetais de forma a estas expressarem uma AAC(6'). Podem utilizar-se outros genes e ADNs quiméricos naturais e artificiais. A este respeito, as sequências de ADN *aac(6')* das SEQ ID N.ºs 1 e 5 podem ser modificadas por: 1) substituição de alguns codões por outros que codificam os mesmos ou diferentes, de preferência os mesmos, aminoácidos; e/ou 2) eliminação ou adição de alguns codões; desde que estas modificações não alterem substancialmente as propriedades, especialmente a capacidade de desintoxicação de antibióticos aminoglicosidos, da AAC(6') codificada.

Todas as publicações referidas neste pedido são desta forma aqui incorporadas por meio de referência.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.
- (B) RUA: Plateaustraat 22
- (C) CIDADE: GENT
- (E) PAÍS: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: B-9000

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MARCADOR GENÉTICO

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 6

(iv) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE SUPORTE: Disquete
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25 (EPO)

(v) DADOS DO PEDIDO ACTUAL

NÚMERO DO PEDIDO: EP 93401237.8

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 612 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADEIAS: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(ix) FUNÇÃO:

(A) NOME/KEY: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..612

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /codon_start- 1

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

ATG GAT CCG AGT ATT CAA CAT TTC CAA ACA AAG TTA GGC ATC ACA AAG	48
Met Asp Pro Ser Ile Gln His Phe Gln Thr Lys Leu Gly Ile Thr Lys	
1 5 10 15	
TAC AGC ATC GTG ACC AAC AGC ACC GAT TCC GTC ACA CTG CGC CTC ATG	96
Tyr Ser Ile Val Thr Asn Ser Thr Asp Ser Val Thr Leu Arg Leu Met	
20 25 30	
ACT GAG CAT GAC CTT GCG ATG CTC TAT GAG TGG CTA AAT CGA TCT CAT	144
Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg Ser His	
35 40 45	
ATC GTC GAG TGG TGG GGC GGA GAA GAA GCA CGC CCG ACA CTT GCT GAC	192
Ile Val Glu Trp Trp Gly Gly Glu Glu Ala Arg Pro Thr Leu Ala Asp	
50 55 60	
GTA CAG GAA CAG TAC TTG CCA AGC GTT TTA GCG CAA GAG TCC GTC ACT	240
Val Gln Glu Gln Tyr Leu Pro Ser Val Leu Ala Gln Glu Ser Val Thr	
65 70 75 80	
CCA TAC ATT GCA ATG CTG AAT GGA GAG CCG ATT GGG TAT GCC CAG TCG	288
Pro Tyr Ile Ala Met Leu Asn Gly Glu Pro Ile Gly Tyr Ala Gln Ser	
85 90 95	
TAC GTT GCT CTT GGA AGC GGG GAC GGA TGG TGG GAA GAA GAA ACC GAT	336
Tyr Val Ala Leu Gly Ser Gly Asp Gly Trp Trp Glu Glu Glu Thr Asp	
100 105 110	
CCA GGA GTA CGC GGA ATA GAC CAG TCA CTG GCG AAT GCA TCA CAA CTG	384
Pro Gly Val Arg Gly Ile Asp Gln Ser Leu Ala Asn Ala Ser Gln Leu	
115 120 125	

GGC AAA GGC TTG GGA ACC AAG CTG GTT CGA GCT CTG GTT GAG TTG CTG 432
 Gly Lys Gly Leu Gly Thr Lys Leu Val Arg Ala Leu Val Glu Leu Leu
 130 135 140

TTC AAT GAT CCC GAG GTC ACC AAG ATC CAA ACG GAC CCG TCG CCG AGC 480
 Phe Asn Asp Pro Glu Val Thr Lys Ile Gln Thr Asp Pro Ser Pro Ser
 145 150 155 160

AAC TTG CGA GCG ATC CGA TGC TAC GAG AAA GCG GGG TTT GAG AGG CAA 528
 Asn Leu Arg Ala Ile Arg Cys Tyr Glu Lys Ala Gly Phe Glu Arg Gln
 165 170 175

GGT ACC GTA ACC ACC CCA GAT GGT CCA GCC GTG TAC ATG GTT CAA ACA 576
 Gly Thr Val Thr Thr Pro Asp Gly Pro Ala Val Tyr Met Val Gln Thr
 180 185 190

CGC CAG GCA TTC GAG CGA ACA CGC AGT GAT GCC TA 612
 Arg Gln Ala Phe Glu Arg Thr Arg Ser Asp Ala
 195 200

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 203 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Pro Ser Ile Gln His Phe Gln Thr Lys Leu Gly Ile Thr Lys
 1 5 10 15

Tyr Ser Ile Val Thr Asn Ser Thr Asp Ser Val Thr Leu Arg Leu Met
 20 25 30

Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg Ser His
 16

	35		40		45														
Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Asp				
	50				55						60								
Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Glu	Ser	Val	Thr				
	65				70					75					80				
Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	Gly	Tyr	Ala	Gln	Ser				
				85					90					95					
Tyr	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Trp	Trp	Glu	Glu	Glu	Thr	Asp				
			100					105						110					
Pro	Gly	Val	Arg	Gly	Ile	Asp	Gln	Ser	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Gln	Leu				
		115					120						125						
Gly	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu	Val	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu				
	130					135							140						
Phe	Asn	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser				
	145					150					155				160				
Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln				
				165						170				175					
Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Gly	Pro	Ala	Val	Tyr	Met	Val	Gln	Thr				
				180					185					190					
Arg	Gln	Ala	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Asp	Ala									
		195							200										

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 54 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADEIAS: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(ix) FUNÇÃO:

(A) NOME/KEY: misc_feature

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..54

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota- "iniciador oligonucleotídico a montante, designado RVA61"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

GATGGATCCG AGTATTCAAC ATTTCCAAAC AAAGTTAGGC ATCACAAAGT ACAG 54

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(ix) FUNÇÃO:

(A) NOME/KEY: misc_feature

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..31

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota- "iniciador oligonucleotídico, designado OFD15"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

AATAATGTCG ACGTCCCCCT CGATGGAAGG G 31

2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 7811 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

- (C) NÚMERO DE CADEIAS: dupla
- (D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(ix) FUNÇÃO:

- (A) NOME/KEY: misc_recomb
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1. .7811
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /legenda- vector pTRVA3

(ix) FUNÇÃO:

- (A) NOME/KEY: misc_feature
- (B) LOCALIZAÇÃO: 194..218
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota- "fronteira direita do T-ADN"

(ix) FUNÇÃO:

- (A) NOME/KEY: misc_feature
- (B) LOCALIZAÇÃO: 484. .684
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota- "a formação 3'-terminal e região de poliadenilação do gene 7 do T-ADN"

(ix) FUNÇÃO:

- (A) NOME/KEY: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: complemento (729. .1340)
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota- "a sequência codificante de aac(6)"

(ix) FUNÇÃO:

- (A) NOME/KEY: promotor
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1341. .1756
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /legenda- promotor 35S

(ix) FUNÇÃO:

- (A) NOME/KEY: misc_feature
- (B) LOCALIZAÇÃO: 3001...3023

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota- "sequências da fronteira esquerda do T-ADN"

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

CGAAGCTCGG	TCCCGTGGGT	GTTCTGTCGT	CTCGTTGTAC	AACGAAATCC	ATTCCCATTG	60
CGCGCTCAAG	ATGGCTTCCC	CTCGGCAGTT	CATCAGGGCT	AAATCAATCT	AGCCGACTTG	120
TCCGGTGAAG	TGGGCTGCAC	TCCAACAGAA	ACAATCAAAC	AAACATACAC	AGCGACTTAT	180
TCACACGAGG	TCAAATTACA	ACGGTATATA	TCCTGCCAGT	CAGCATCATC	ACACCAAAG	240
TTAGGCCCGA	ATAGTTTGAA	ATTAGAAAGC	TCGCAATTGA	GGTCTACAGG	CCAAATTCGC	300
TCTTAGCCGT	ACAATATTAC	TCACCGGTGC	GATGCCCCC	ATCGTAGGTG	AAGGTGGAAA	360
TTAATGATCG	ATCTTGAGAC	CACAGGCCCA	CAACAGCTAC	CAGTTTCTC	AAGGTCCAC	420
CAAAAACGTA	AGCGCTTACG	TACATGGTCG	ATAAGAAAAG	GCAATTTGTA	GATGTTAATT	480
CCCATCTTGA	AAGAAATATA	GTTTAAATAT	TTATTGATAA	AATAACAAGT	CAGGTATTAT	540
AGTCCAAGCA	AAAACATAAA	TTTATTGATG	CAAGTTTAAA	TTCAGAAATA	TTTCAATAAC	600
TGATTATATG	AGCTGGTACA	TTGCCGTAGA	TGAAAGACTG	AGTGCGATAT	TATGTGTAAT	660
ACATAAATTG	ATGATATAGC	TAGCTTAGCT	CATCGGGGGA	TCTGTGACG	TCCCCCTCGA	720
TGGAAGGGTT	AGGCATCACT	GCGTGTTCGC	TCGAATGCCT	GGCGTGTG	AACCATGTAC	780
ACGGCTGGAG	CATCTGGGGT	GGTTACGGTA	CCTTGCCTCT	CAAACCCCGC	TTTCTCGTAG	840
CATCGGATCG	CTCGCAAGTT	GCTCGGCGAC	GGGTCCGTTT	GGATCTTGGT	GACCTCGGGA	900
TCATTGAACA	GCAACTCAAC	CAGAGCTCGA	ACCAGCTTGG	TTCCCAAGCC	TTTGCCAGT	960
TGTGATGCAT	TCGCCAGTGA	CTGGTCTATT	CCGCGTACTC	CTGGATCGGT	TTCTTCTCC	1020
CACCATCCGT	CCCCGCTTCC	AAGAGCAACG	TACGACTGGG	CATACCCAAT	CGGCTCTCCA	1080
TTCAGCATTG	CAATGTATGG	AGTGACGGAC	TCTTGCCTA	AAACGCTTGG	CAAGTACTGT	1140
TCCTGTACGT	CAGCAAGTGT	CGGGCGTGCT	TCTTCTCCGC	CCCACCACTC	GACGATATGA	1200
GATCGATTTA	GCCACTCATA	GAGCATCGCA	AGGTCATGCT	CAGTCATGAG	GCGCAGTGTG	1260
ACGGAATCGG	TGCTGTTGGT	CACGATGCTG	TACTTTGTGA	TGCCTAACTT	TGTTTGAAA	1320
TGTTGAATAC	TCGGATCCAT	CGATTTGTAG	AGAGAGACTG	GTGATTCAG	CGTGTCTCT	1380
CCAAATGAAA	TGAACCTCCT	TATATAGAGG	AAGGGTCTTG	CGAAGGATAG	TGGGATTGTG	1440
CGTCATCCCT	TACGTCAGTG	GAGATATCAC	ATCAATCCAC	TTGCTTTGAA	GACGTGGTTG	1500
GAACGTCTTC	TTTTCCACG	ATGCTCCTCG	TGGGTGGGGG	TCCATCTTGG	GGACCACTGT	1560
CGGCAGAGGC	ATCTTGAACG	ATAGCCTTTC	CTTTATCGCA	ATGATGGCAT	TTGTAGGTGC	1620

CACCTTCCTT	TTCTACTGTC	CTTTTGATGA	AGTGACAGAT	AGCTGGGCAA	TGGAATCCGA	1680
GGAGGTTTCC	CGATATTACC	CTTTGTTGAA	AAGTCTCAAT	AGCCCTTTGG	TCTTCTGAGA	1740
CTGTATCTTT	GATATTCTTG	GAGTAGACGA	GAGTGTCTGT	CTCCACCATG	TTGACGAAGA	1800
TTTTCTTCTT	GTCATTGAGT	CGTAAAAGAC	TCTGTATGAA	CTGTTCGCCA	GTCTTCACGG	1860
CGAGTTCTGT	TAGATCCTCG	ATCTGAATTT	TTGACTCCAT	GGCCTTTGAT	TCAGTAGGAA	1920
CTACTTTCTT	AGAGACTCCA	ATCTCTATTA	CTTGCCCTGG	TTTATGAAGC	AAGCCTTGAA	1980
TCGTCCATAC	TGGAATAGTA	CTTCTGATCT	TGAGAAATAT	ATCTTTCTCT	GTGTTCCTGA	2040
TGCAGTTAGT	CCTGAATCTT	TTGACTGCAT	CTTTAACCTT	CTTGGGAAGG	TATTTGATCT	2100
CCTGGAGATT	ATTACTCGGG	TAGATCGTCT	TGATGAGACC	TGCCCGTAG	GCCTCTCTAA	2160
CCATCTGTGG	GTCAGCATTC	TTTCTGAAAT	TGAAGAGGCT	AATCTTCTCA	TTATCGGTGG	2220
TGAACATGGT	ATCGTCACCT	TCTCCGTCTGA	ACTTTCTTCC	TAGATCGTAG	AGATAGAGAA	2280
AGTCGTCCAT	GGTGATCTCC	GGGGCAAAGG	AGATCTTATA	ATTAAATGGC	CTTCGCTGCC	2340
CATATTATTG	GTAACCAAC	AGCATCAATC	ACGGGATTTT	TCTCGAATTA	ATTGCGTCGA	2400
ATCTCAGCAT	CGAAATATTC	GCCTTTTTCTG	TCCATTAGAC	TATCTATTGT	GATGGTGGAT	2460
TTATCACAAA	TGGGACCCGC	CGCCGACAGA	GGTGTGATGT	TAGGCCAGGA	CTTTGAAAAT	2520
TTGCGCAACT	ATCGTATAGT	GGCCGACAAA	TTGACGCCGA	GTTGACAGAC	TGCCTAGCAT	2580
TTGAGTGAAT	TATGTGAGGT	AATGGGCTAC	ACTGAATTGG	TAGCTCAAAC	TGTCAGTATT	2640
TATGTATATG	AGTGTATATT	TTCGCATAAT	CTCAGACCAA	TCTGAAGATG	AAATGGGTAT	2700
CTGGGAATGG	CGAAATCAAG	GCATCGATCG	TGAAGTTTCT	CATCTAAGCC	CCCATTGGA	2760
CGTGAATGTA	GACACGTCGA	AATAAAGATT	TCCGAATTAG	AATAATTTGT	TTATTGCTTT	2820
CGCCTATAAA	TACGACGGAT	CGTAATTTGT	CGTTTTATCA	AAATGTACTT	TCATTTTATA	2880
ATAACGCTGC	GGACATCTAC	ATTTTTGAAT	TGAAAAAATA	TTGGTAATTA	CTCTTTCTTT	2940
TTCTCCATAT	TGACCATCAT	ACTCATTGCT	GATCCATGTA	GATTTCCCGG	ACATGAAGCC	3000
ATTTACAATT	GAATATATCC	TGCCGCCGCT	GCCGCTTTGC	ACCCGGTGGA	GCTTGCATGT	3060
TGGTTTCTAC	GCAGAACTGA	GCCGGTTAGG	CAGATAATTT	CCATTGAGAA	CTGAGCCATG	3120
TGCACCTTCC	CCCCAACACG	GTGAGCGACG	GGGCAACGGA	GTGATCCACA	TGGGACTTTT	3180
AAACATCATC	CGTCGGATGG	CGTTGCGAGA	GAAGCAGTCG	ATCCGTGAGA	TCAGCCGACG	3240
CACCGGGCAG	GCGCGCAACA	CGATCGCAAA	GTATTTGAAC	GCAGGTACAA	TCGAGCCGAC	3300
GTTACCGGTA	CCGGAACGAC	CAAGCAAGCT	AGCTTAGTAA	AGCCCTCGCT	AGATTTTAAT	3360
GCGGATGTTG	CGATTACTTC	GCCAACTATT	GCGATAACAA	GAAAAAGCCA	GCCTTTCATG	3420
ATATATCTCC	CAATTTGTGT	AGGGCTTATT	ATGCACGCTT	AAAAATAATA	AAAGCAGACT	3480
TGACCTGATA	GTTTGGCTGT	GAGCAATTAT	GTGCTTAGTG	CATCTAACGC	TTGAGTTAAG	3540

CCGCGCCGCG	AAGCGGCGTC	GGCTGAACG	AATTGTTAGA	CATTATTTGC	CGACTACCTT	3600
GGTGATCTCG	CCTTTCACGT	AGTGGACAAA	TTCTTCCAAC	TGATCTGCGC	GCGAGGCCAA	3660
GCGATCTTCT	TCTTGTCCAA	GATAAGCCTG	TCTAGCTTCA	AGTATGACGG	GCTGATACTG	3720
GGCCGGCAGG	CGCTCCATTG	CCCAGTCGGC	AGCGACATCC	TTCGGCGCGA	TTTTGCCGGT	3780
TACTGCGCTG	TACCAAATGC	GGGACAACGT	AAGCACTACA	TTTCGCTCAT	CGCCAGCCCA	3840
GTCGGGCGGC	GAGTTCCATA	GCGTTAAGGT	TTCATTTAGC	GCCTCAAATA	GATCCTGTTC	3900
TGCTTTTGTG	AGCAAGATAG	CCAGATCAAT	GTCGATCGTG	GCTGGCTCGA	AGATACCTGC	4020
AAGAATGTCA	TTGCGCTGCC	ATTCTCCAAA	TTGCAGTTCG	CGCTTAGCTG	GATAACGCCA	4080
TCCAGGGGAA	GCCGAAGTTT	GCAAAAAGGTG	GTTGATCAAA	GCTCGCCGCG	TTGTTTCATC	4200
AAGCCTTAGC	GTCACCGTAA	CCAGCAAATC	AATATCACTG	TGTGGCTTCA	GGCCGCCATC	4260
CACTGCGGAG	CCGTACAAAT	GTACGGCCAG	CAACGTCGGT	TCGAGATGGC	GCTCGATGAC	4320
GCCAACTACC	TCTGATAGTT	GAGTCGATAC	TTCGGCGATC	ACCGCTTCCC	TCATGATGTT	4380
TAACTTTGTT	TTAGGGCGAC	TGCCCTGCTG	CGTAACATCG	TTGCTGCTCC	ATAACATCAA	4440
ACATCGACCC	ACGGCGTAAC	GCGCTTGCTG	CTTGGATGCC	CGAGGCATAG	ACTGTACCCC	4500
AAAAAACAG	TCATAACAAG	CCATGAAAAC	CGCCACTGCG	CCGTTACCAC	CGCTGCGTTC	4560
GGTCAAGGTT	CTGGACCAGT	TGCGTGAGCG	CATACGCTAC	TTGCATTACA	GCTTACGAAC	4620
CGAACAGGCT	TATGTCCACT	GGGTTGCTGC	CTTCATCCGT	TTCCACGGTG	TGCGTCACCC	4680
GGCAACCTTG	GGCAGCAGCG	AAGTCGAGGC	ATTTCTGTCC	TGGCTGGCGA	ACGAGCGCAA	4740
GGTTTCGGTC	TCCACGCATC	GTCAGGCATT	GGCGGCCTTG	CTGTTCTTCT	ACGGCAAGTG	4800
CTGTGCACGG	ATCTGCCCTG	GCTTCAGGAG	ATCGGAAGAC	CTCGGCCGTC	CGGGCGCTTG	4860
CCGGTGGTGC	TGACCCCGGA	TGAAGTGTT	CGCATCCTCG	GTTTTCTGGA	AGGCGAGCAT	4920
CGTTTGTTG	CCCAGCTTCT	GTATGGAACG	GGCATGCGGA	TCAGTGAGGG	TTTGCAACTG	4980
CGGGTCAAGG	ATCTGGATT	CGATCACGGC	ACGATCATCG	TGCGGGAGGG	CAAGGGCTCC	5040
AAGGATCGGG	CCTTGATGTT	ACCCGAGAGC	TTGGCACCCA	GCCTGCGCGA	GCAGCTGCCT	5100
CGCGCGTTTC	GGTGATGACG	GTGAAAACCT	CTGACACATG	CAGCTCCCGG	AGACGGTCAC	5160
AGCTTGCTG	TAAGCGGATG	CCGGGAGCAG	ACAAGCCCCT	CAGGGCGCGT	CAGCGGGTGT	5220
TGGCGGGTGT	CGGGGCGCAG	CCATGACCCA	GTCACGTAGC	GATAGCGGAG	TGTATACTGG	5280
CTTAACTATG	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	5340
CCGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	5400
GACTCGCTGC	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	5460
ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	5520
CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	5580

CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	5640
TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	5700
CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGCGCGT	TTCTCAATGC	5760
TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTGCGT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	5820
GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	5880
CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	5940
AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC	AGAGTCTTGG	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	6000
AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	6060
AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	6120
CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	6180
GACGCTCAGT	GGAACGAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	6240
ATCTTCACCT	AGATCCTTTT	AAATTAATAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT	6300
GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	6360
TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG	TGTAGATAAC	TACGATACGG	6420
GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	6480
CCAGATTTAT	CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	6540
ACTTTATCCG	CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCG	6600
CCAGTTAATA	GTTTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTGCAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	6660
TCGTTTGTA	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	6720
CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC	TTCGGTCTCT	CGATCGTTGT	GAGAAGTAAG	6780
TTGGCCGCAG	TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTGATG	6840
CCATCCGTAA	GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	6900
TGTATGCGGC	GACCGAGTTG	CTCTTGCCCG	GCGTCAACAC	GGGATAATAC	CGCGCCACAT	6960
AGCAGAACTT	TAAAAGTGCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	7020
ATCTTACCGC	TGTTGAGATC	CAGTTCGATG	TAACCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	7080
GCATCTTTTA	CTTTCACCAG	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	7140
AAAAAGGGAA	TAAGGGCGAC	ACGAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT	7200
TATTGAAGCA	TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT	ACATATTTGA	ATGTATTTAG	7260
AAAAATAAAC	AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTTCCCCGAA	AAGTGCCACC	TGACGTCTAA	7320
GAAACCATTA	TTATCATGAC	ATTAACCTAT	AAAAATAGGC	GTATCACGAG	GCCCTTTCGT	7380
CTTCGAATAA	ATACCTGTGA	CGGAAGATCA	CTTCGCAGAA	TAAATAAATC	CTGGTGTCCC	7440
TGTTGATACC	GGGAAGCCCT	GGGCCAACTT	TTGGCGAAAA	TGAGACGTTG	ATCGGCACGT	7500

Pro Gly Val Arg Gly Ile Asp Gln Ser Leu Ala Asn Ala Ser Gln Leu
 115 120 125
 Gly Lys Gly Leu Gly Thr Lys Leu Val Arg Ala Leu Val Glu Leu Leu
 130 135 140

 Phe Asn Asp Pro Glu Val Thr Lys Ile Gln Thr Asp Pro Ser Pro Ser
 145 150 155 160

 Asn Leu Arg Ala Ile Arg Cys Tyr Glu Lys Ala Gly Phe Glu Arg Gln
 165 170 175

 Gly Thr Val Thr Thr Pro Asp Gly Pro Ala Val Tyr Met Val Gln Thr
 180 185 190

 Arg Gln Ala Phe Glu Arg Thr Arg Ser Asp Ala *
 195 200

Lisboa, 31 OUT. 2001
Aventis CropScience N.V.



ENG.º MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial de Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Marcador genético quimérico seleccionável para transformar uma célula vegetal ou planta de forma a torná-la resistente a um antibiótico aminoglicosido, compreendendo o referido marcador genético os seguintes fragmentos de ADN ligados de forma operacional:

a) um promotor que pode ser expresso em plantas;

b) um ADN que codifica uma aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase capaz de modificar o referido antibiótico aminoglicosido; e

c) uma formação 3'-terminal e região de poliadenilação activa em células vegetais;

e sendo a referida aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase capaz de acetilar pelo menos a canamicina.

2. Marcador genético quimérico seleccionável da reivindicação 1, no qual o referido ADN que codifica uma aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase pode ser obtido por amplificação por PCR utilizando iniciadores, onde pelo menos um dos iniciadores tem a sequência de ADN da SEQ ID N.º 3 ou da SEQ ID N.º 4.

3. Marcador genético quimérico seleccionável da reivindicação 2, no qual o referido ADN que codifica uma aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase tem a sequência de ADN da SEQ ID N.º 1.

4. Marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, no qual a referida aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase codificada tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N.º 2.

5. Marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que é integrado no ADN nuclear de uma célula vegetal.

6. Vector de transformação de plantas que contém o marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

7. Vector de transformação de plantas da reivindicação 6, que é um plasmídeo-Ti.
8. Agrobacterium tumefaciens que contém o vector da reivindicação 7.
9. Célula vegetal cujo ADN nuclear contém o marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
10. Cultura de células vegetais que compreende uma pluralidade de células vegetais da reivindicação 9.
11. Semente que compreende o marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
12. Planta que compreende o marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
13. Método para seleccionar ou identificar células vegetais transformadas usando um antibiótico aminoglicosido, compreendendo o referido método os passos de:

transformação das células vegetais com um ADN estranho que compreende o marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4; seguida de crescimento das referidas células transformadas com concentrações do referido antibiótico aminoglicosido que são letais ou supressoras do crescimento para células não transformadas.
14. Método da reivindicação 13, no qual o referido antibiótico aminoglicosido é a canamicina.
15. Método para tornar uma célula vegetal resistente a um antibiótico aminoglicosido, compreendendo o referido método o passo de transformação do ADN nuclear da referida célula com o marcador genético seleccionável quimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
16. Método da reivindicação 15, no qual o referido antibiótico aminoglicosido é a canamicina.

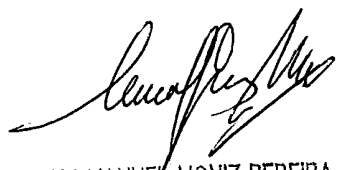
17. Método para desintoxicar um antibiótico aminoglicosido numa célula vegetal, compreendendo o método o passo de disponibilização do marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 no ADN nuclear da célula.

18. Utilização do marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 para produzir uma aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase nas células de uma planta.

19. Utilização do marcador genético quimérico seleccionável de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 para tornar uma célula vegetal ou uma planta resistentes a um antibiótico aminoglicosido.

Lisboa, 31 OUT. 2001

Por Aventis CropScience N.V.



ENG.º MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

RESUMO

MARCADOR GENÉTICO

Método para seleccionar e identificar células vegetais transformadas, através da expressão de um gene quimérico que codifica uma aminoglicosido-6'-N-acetiltransferase nas células vegetais, na presença de um antibiótico aminoglicosido.