



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS  
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

## CARTA PATENTE Nº PI 0804324-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0804324-8

(22) Data do Depósito: 13/10/2008

(43) Data da Publicação do Pedido: 13/07/2010

(51) Classificação Internacional: C12N 1/15; C12N 15/84; C12N 15/81

(54) Título: MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS MEDIADA POR AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, Diretor(a). CGC/CPF:88648761000103. Endereço: Rua Francisco G. Vargas, 1130, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070560

(72) Inventor: SERGIO ECHEVERRIGARAY LAGUNA; MANUELA FIGUEIRÓ

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 13/10/2008, observadas as condições legais

Expedida em: 27 de Setembro de 2016.

Assinado digitalmente por:  
**Júlio César Castelo Branco Reis Moreira**  
Diretor de Patente



**Relatório Descritivo de Patente de Invenção****MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS MEDIADA POR  
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*****Campo da Invenção**

[0001] A presente invenção descreve um método de transformação de células, em especial, leveduras de interesse biotecnológico, transformadas geneticamente por meio da bactéria comumente encontrada em solo e utilizada como vetores para a produção de OGM's em dicotiledôneas, a *Agrobacterium tumefaciens*. A presente invenção situa-se principalmente no campo da biotecnologia.

**Antecedentes da Invenção****Leveduras**

[0002] Com o advento das técnicas de DNA recombinante uma série de estudos foram realizados para a determinação de genes e proteínas em organismos de interesse que podem ter seu uso ampliado em processos industriais. Dessa forma, dentre todas as leveduras existentes, somente *Saccharomyces cerevisiae* possui seu genoma seqüenciado e todas suas ORFs (*Open read frames*) determinadas.

[0003] Dessa maneira, a utilização de um vetor que possui taxa celular *in natura* por tecidos do hospedeiro e formas de integração de porções específicas do seu DNA no interior do genoma desses, tem sido uma alternativa importante para a verificação de genes e enzimas, uma vez que essa tecnologia possui reduzidos custos e alta eficiência na obtenção de mutantes por inserção, transformação e clonagem gênica.

**Agrobacterium**

[0004] As biovariedades de *Agrobacterium* se distribuem em quase todos os tipos de solos, cultivados ou não e, especificamente na rizosfera de plantas contaminadas, podendo ser encontradas nas raízes, como formadora de

galhas ou excesso de raízes, ou ainda no solo adjacente.

**[0005]** O conceito de utilização dessa bactéria como vetor para criação de plantas transgênicas teve início há pelo menos 25 anos atrás. Hoje, esse vetor de transformação genética de plantas é amplamente empregado em espécies agrônômicas e ornamentais de interesse econômico mundial.

**[0006]** A taxonomia atual de *Agrobacterium* foi determinada por meio do seqüenciamento total do genoma da linhagem C58 de *A. tumefaciens*. Assim, foram criados 3 grupos de classificação dessas espécies em relação à sua biovariedade - *A. tumefaciens* e *A. rubi* pertencem a biovariedade I, *A. rhizogenes* à biovariedade II e *A. vitis* à biovariedade III (Gelvin, 2003).

**[0007]** Em geral, o gênero *Agrobacterium* caracteriza-se por apresentar organismos, que possuem a capacidade de transferir porções de DNA para outros seres, incluindo numerosas espécies de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, fungos filamentosos, leveduras e células animais.

#### T-DNA

**[0008]** T-Dna é o DNA de transferência do plasmídeo indutor de tumor (Ti) de algumas espécies de bactérias, como *Agrobacterium*, que transferem parte do seu DNA para o hospedeiro (células de plantas e não-plantas). Os genes de virulência (vir), também localizados no plasmídeo Ti, codificam proteínas envolvidas com o transporte do T-DNA para dentro da célula de plantas. Uma vez dentro do núcleo, o T-DNA possui habilidade de se integrar ao genoma da planta por um mecanismo de recombinação. Com isso, a bactéria reprograma a célula para crescer como um tumor e produzir a única fonte de alimento da bactéria.

**[0009]** Em publicações recentes têm se demonstrado a utilização desse vetor em células humanas, como em tecidos laboratoriais HeLa (Kunik *et al.*, 2001), na tentativa de induzir a expressão de genes de interesse, introduzindo tal ferramenta molecular na terapia gênica.

**[0010]** Além disso, apesar dessa forma de transformação já ser bastante conhecida em plantas, por exemplo, em muitas leveduras ainda não tinha sido

descrita. Utilizamos a forma de processamento segundo Bundock *et al*, 1999, modificado em relação às micras das membranas indicadas pelos autores. Esse fator fez com que obtivéssemos números de transformantes elevados perante a bibliografia, o que nos evidencia a importância da patente para esse processo de obtenção de leveduras transformadas geneticamente com membranas distintas e poros diferentes.

**[0011]** No âmbito patentário, muitos documentos versam sobre leveduras e *Agrobacterium*.

**[0012]** O documento EP 486,234 descreve o uso de espécies de agrobactérias para transformação em plantas, produzindo altas taxas de transformantes estáveis em monocotiledôneas e dicotiledôneas. A presente invenção difere desse documento pela transformação não ocorrer em plantas, mas sim, em leveduras.

**[0013]** O documento WO 01/44482 descreve um T-DNA de transferência otimizado para produzir plantas transgênicas, leveduras e/ou eucariotos, no qual o T-DNA compreende bordas flanqueadoras geneticamente modificadas para prevenir a integração do vetor de transformação no esqueleto das seqüências. A presente invenção difere desse documento pela transformação não compreender T-DNAs modificados e pelo processo descrito ser diferente do respectivo documento.

**[0014]** O documento EP 1,130,105 descreve a transformação de células eucarióticas por *Agrobacterium* compreendendo inserir material genético em um plasmídeo, transferir esse plasmídeo para a *Agrobacterium* e cocultivar a *Agrobacterium* com células eucarióticas. A presente invenção difere desse documento por utilizar suportes de celulose para o co-cultivo de leveduras e *Agrobacterium*.

**[0015]** As referências aqui listadas circunscrevem a presente invenção, sem, contudo, antecipá-la ou sequer sugerir seus objetos.

### **Objetos da Invenção**

**[0016]** É um objeto da presente invenção o método de transformação de células compreendendo:

- a) realizar o crescimento das células-alvo em meio adequado;
- b) realizar o crescimento de *Agrobacterium* em meio adequado compreendendo pelo menos um vetor de clonagem;
- c) contactar as células-alvo de a) com *Agrobacterium*;
- d) co-cultivar c) sob suportes de celulose, em meio adequado.

**[0017]** Em uma realização preferencial, os suportes de celulose compreendem 100% de celulose, papel Whatman<sup>®</sup> número 1 e papel Whatman<sup>®</sup> número 42, os quais apresentam porosidade entre 2,5 µm e 11 µm.

**[0018]** Em uma realização preferencial, o crescimento de a) e b) é realizado sob temperatura de 22° a 28°C, sendo: i) crescimento por 16 a 24 horas seguido por ii) crescimento por 4 a 8 horas;

**[0019]** Em uma realização preferencial as células-alvo são leveduras e seu crescimento ocorre em meio YEPD.

**[0020]** Em uma realização preferencial, o crescimento da *Agrobacterium* de b) ocorre em meio MYA com antibiótico adequado, preferencialmente canamicina.

**[0021]** Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza o plaqueamento em gota para realizar os cálculos posteriores da taxa de transformantes.

**[0022]** Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza um gene repórter (GFP) para verificar a presença do vetor de clonagem nos transformantes de c).

**[0023]** É um objeto adicional da presente invenção uma célula-alvo transformada compreendendo o transformante obtido acima.

**[0024]** É um adicional objeto da presente invenção uma composição farmacêutica compreendendo:

- a) pelo menos uma célula-alvo transformada; e
- b) veículo aceitável.

[0025] Esses e outros objetos da invenção serão valorizados e melhor compreendidos pelos versados na arte a partir da descrição detalhada a seguir.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0026] Os exemplos a seguir não têm a intenção de limitar a invenção, mas somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de concretizá-la. Diversas variantes podem ser preparadas a partir dos ensinamentos da presente invenção.

#### **Células-Alvo**

[0027] As "células-alvo" úteis na presente invenção incluem todas as células capazes de serem transformadas. Tais células incluem, sem contudo limitar, leveduras. As leveduras úteis na presente invenção incluem, sem contudo limitar, leveduras pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Schwaniomyces*, *Pichia*, *Schizosacharomyces*, *Kloeckera*, *Lipomyces* e *Kluyveromyces*.

[0028] Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza as seguintes leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* (AH22), *K. marxianus* var. *marxianus* (IZ1339), *Saccharomyces cerevisiae* (W303), *Candida albicans*, *Candida pseudotropicalis*, *Schwaniomyces castelli* (58-7), *Pichia fermentalis* (IZ430), *Schizosacharomyces pombe* (IZ871), *Kloeckera africana* (IZ98), *Kluyveromyces fragilis* (IZ610) e *Lypomices starkeyi* (CBS5910).

#### **Agrobacterium**

[0029] As bactérias utilizadas para a etapa de transformação incluem as bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, em especial a *Agrobacterium tumefaciens*, ou quaisquer organismos que possuam material biológico de *Agrobacterium*. Em especial, a presente invenção utiliza *Agrobacterium tumefaciens* (637).

[0030] As bactérias possuem material genético em seu interior, os quais serão transmitidos à célula-alvo no processo de transformação. Tal material genético inclui, sem contudo limitar, plasmídeos compreendendo o gene de

interesse. A construção desses plasmídeos e a introdução na bactéria são realizados a partir de métodos conhecidos no estado da técnica.

#### Método de Transformação

**[0031]** O “método de transformação” das células-alvo compreende as seguintes etapas:

- a) realizar o crescimento das células-alvo em meio adequado;
- b) realizar o crescimento de *Agrobacterium* em meio adequado compreendendo pelo menos um vetor de clonagem;
- c) contactar as células-alvo de a) com *Agrobacterium*;
- d) co-cultivar c) sob suporte de celulose, em meio adequado.

#### Meio adequado

**[0032]** O “meio adequado” da presente invenção compreende qualquer meio de cultura adequado ao organismo que o utiliza para seu crescimento. Em especial, a presente invenção utilizou meio YEPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% de ágar, pH 6,8) para leveduras. Em especial, a presente invenção utilizou meio MYA (0,8% de manitol, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 0,2% de sulfato de amônia, 0,05% de caseína hidrolizada e 1,2% de ágar, pH 6,7) com canamicina para *Agrobacterium*.

#### Suporte de celulose

**[0033]** O “suporte de celulose” da presente invenção compreende qualquer suporte compreendendo celulose, um polímero de cadeia longa que pode ser encontrado puro ou combinado com outros compostos nos ditos suportes. Em especial, os suportes de celulose possuem elevado teor de capilaridade, aumentando a absorção, a aderência célula-célula e a taxa de transformantes. Em especial, a presente invenção utiliza suporte de celulose 100%, papel Whatman® número 1 e papel Whatman® número 42, os quais apresentam porosidade entre 2,5 µm e 11 µm.

#### **Exemplo 1 – Transformação de leveduras**

**[0034]** A presente invenção consiste da transformação de leveduras

(descritas na tabela 1) de interesse biotecnológico via *Agrobacterium tumefaciens*. Para isso utilizou-se o protocolo descrito por Bundock *et al*, 1999, modificado.

**[0035]** Nesse sentido as amostras de leveduras foram crescidas de 16 a 24 horas em meio YEPD ((2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% ágar, pH 6,8), sob agitação vigorosa e temperatura na faixa de 22 a 28°C. Da mesma maneira a *A. tumefaciens* também foi crescida de 16 a 24 horas em meio MYA com adição de canamicina na faixa de 20 a 80 µg/ml, agente seletivo do plasmídeo introduzido, pCAMBIA 1302 (0,8% de manitol, 0,5% extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 0,2% sulfato de amônia, 0,05% caseína hidrolizada e 1,2% ágar pH 6,7) nas mesmas condições.

Tabela 01. Leveduras utilizadas no presente trabalho

Organismo	Origem	Linhagem
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	(AH22)
2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i>	ESALQ	(IZ 1339/Killer)
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ESALQ	(W303)
4. <i>Candida albicans</i>	PUCRS	-
5. <i>Candida pseudotropicalis</i>	ESALQ	(IZ809)
6. <i>Schwaniomyces castelli</i>	ESALQ	(IZ58-7)
7. <i>Pichia fermentatis</i>	ESALQ	(IZ430)
8. <i>Schizosacharomyces pombe</i>	ESALQ	(IZ871)
9. <i>Kloeckera africana</i>	ESALQ	(IZ98)
10. <i>Lipomyces starkeyi</i>	Center for Biological Sequence Analysis (Alemanha)	(CBS5910)
11. <i>Kluyveromyces fragilis</i>	ESALQ	(IZ610)

**[0036]** A seguir essas amostras foram novamente crescidas na faixa de tempo de 4 a 8 horas sob as mesmas condições citadas anteriormente, em meio renovado, com a adição dos respectivos agentes seletivos.

**[0037]** Em seguida, em torno de 0,5 a 1 mL de cada um dos organismos



foram misturados e adicionados sob membrana millipore de poro de 0,22 $\mu$  e papel filtro qualitativo fitec sob meio YEPD adicionado de canamicina para a levedura *Candida pseudotropicalis*. Sob tais membranas, as células misturas gentilmente foram dispostas numa faixa de alíquota em torno de 0,5 a 1 mL. Essa placa permaneceu em temperatura controlada na faixa específica de 22 a 28°C, de 1 a 5 dias. As mesmas membranas foram também testadas para *S. cerevisiae* (AH22), juntamente com os filtros millipores de 0,45 $\mu$ , papel Whatman® número 1 e papel Whatman® número 42, os quais apresentam porosidade entre 2,5  $\mu$ m e 11  $\mu$ m.

**[0038]** Neste mesmo momento são feitas placas de análise da quantidade de *A. tumefaciens* e leveduras totais que foram adicionadas no co-cultivo em meios de cultura com agentes seletivos próprios para cada um dos organismos (canamicina e fungicida – teraciclina). Esses plaqueamentos se deram pelo método da gota usando cerca de 0,05 mL. Cada crescimento de colônia foram contados após cerca de 16 a 24 horas. O número de colônias totais obtidas foram utilizados para o cálculo do número total de transformantes.

**[0039]** Assim, a presente invenção consiste na produção das onze leveduras indicadas na tabela 1 como organismos geneticamente modificados por meio da introdução do vetor com taxia natural por células hospedeiras em geral, *A. tumefaciens*. Dessa forma, após a incubação do co-cultivo, a membrana é lavada em cerca de 1 a 5 mL de Cloreto de sódio 0,9%. Após a liberação total das células co-cultivadas foi utilizado o método da gota para contagem do número de leveduras transformantes e a produção dos percentuais finais para a constatação elevada da taxa de transformante obtida nessa patente.

**[0040]** Dessa maneira, as células co-cultivadas são plaqueadas pelo método da gota em meio YEPD adicionado de canamicina, tetraciclina (concentração comumente utilizada para inibição bacteriana e higromicina (faixa de concentração usada 0,5 -35 $\mu$ g/mL). Da mesma maneira as células

são também plaqueadas em meio MYA (fungicida e canamicina) e YEPD (tetraciclina), para a detecção dos controles.

**[0041]** Posteriormente a um período de cerca de 16 a 24 horas incubadas em temperatura de 22 até 28°C, foi possível a contagem do número de leveduras transgênicas obtidas na patente (tabela 2 e tabela 3).

Tabela 02: Correlação entre a quantidade de bactéria e levedura antes e depois do co-cultivo e a taxa de transformantes.

Amostras	Levedura		Agrobactéria		Transformante
	Anterior (a) UFC/ml	Posterior (b) UFC/ml	Anterior (a) UFC/ml	Posterior (b) UFC/ml	Total UFC/ml
1	$8 \times 10^5$	$25,6 \times 10^5$	$30,5 \times 10^8$	$107 \times 10^8$	$5,61 \times 10^4$
2	$1 \times 10^6$	$19,0 \times 10^6$	$13,6 \times 10^6$	$52,3 \times 10^6$	$8,63 \times 10^4$
3	$3,1 \times 10^4$	$30,7 \times 10^4$	$105,3 \times 10^4$	$181 \times 10^4$	$7,92 \times 10^2$
4	$8,4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$9,96 \times 10^7$	$105 \times 10^3$	$2,98 \times 10^5$
5	$5,2 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	$6,3 \times 10^7$	$9,9 \times 10^7$	$9,1 \times 10^1$
6	$5,2 \times 10^5$	$22,3 \times 10^5$	$19,7 \times 10^5$	$97,2 \times 10^4$	$32,1 \times 10^1$
7	$24,3 \times 10^4$	$102,2 \times 10^5$	$19,6 \times 10^5$	$104,2 \times 10^4$	$20,8 \times 10^1$
8	$30,9 \times 10^3$	$7,73 \times 10^5$	$21,2 \times 10^8$	$79,5 \times 10^5$	$42,3 \times 10^3$
9	Sem crescimento	Sem crescimento	$21,2 \times 10^8$	$79,5 \times 10^5$	Sem crescimento
10	$30,4 \times 10^6$	$46 \times 10^8$	$57,3 \times 10^8$	$94 \times 10^5$	$17,6 \times 10^8$
11	$159,4 \times 10^2$	$132,1 \times 10^2$	$57,3 \times 10^8$	$94 \times 10^5$	Sem crescimento

Legenda da tabela 02: a: anterior ao co-cultivo (média das três placas e das cinco repetições); b: posterior ao co-cultivo (média das três placas e das cinco repetições); Transformantes: Taxa de transformação (média das três placas e cinco repetições) – Amostras 1: *S. cerevisiae* AH22; 2: *K. marxianus* var. *marxianus* IZ1339; 3: *Saccharomyces cerevisiae* W303; 4: *Candida albicans*; 5: *Candida pseudotropicalis* 6: *Schwaniomyces castelli* (IZ 58-7); 7: *Pichia fermentatis* (IZ430); 8: *Schizosacharomyces pombe* ( IZ 871); 9: *Kloeckera africana* (IZ 98) – flocculante; 10: *Kluyveromyces fragilis* (IZ 610) e 11: *Lipomyces starkeyi* (CBS5910); todos resultados dados em UFC/ml.

Tabela 03. Percentagens total das leveduras transformadas, cálculo normal de

porcentagem feito com base no número de crescimentos posteriores e dos transformantes.

Leveduras	Porcentagem total de transformantes
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22	107,5% ( $9,6 \times 10^8 - 10,3 \times 10^8$ )
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> IZ1339	44,1% ( $39 \times 10^8 - 17,2 \times 10^8$ )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303	16,1% ( $0,98 \times 10^8 - 0,158 \times 10^8$ )
<i>Candida albicans</i>	116,9% ( $69 \times 10^8 - 59 \times 10^8$ )
<i>Candida pseudotropicalis</i>	0,135% ( $134,8 \times 10^8 - 0,182 \times 10^8$ )
<i>Schwaniomyces castelli</i> (IZ 58-7)	14,34% ( $4,46 \times 10^8 - 0,64 \times 10^8$ )
<i>Pichia fermentatis</i> (IZ430)	2,039% ( $20,4 \times 10^8 - 0,416 \times 10^8$ )
<i>Schizosacharomyces pombe</i> (IZ 871)	0,543% ( $15,46 \times 10^8 - 0,084 \times 10^8$ )
<i>Kloeckera africana</i> (IZ 98) – floculante	0% - floculante
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (IZ 610)	( $46 \times 10^8 - 17,6 \times 10^8$ )
<i>Lipomyces starkeyi</i> (CBS5910)	0%

**[0042]** Cabe salientar nessa patente que a levedura *Kloeckera africana* (IZ 98), não transforma por esse método *in natura* de produção de transgênicos, por ser uma linhagem floculante.

**[0043]** Pudemos verificar a capilaridade dos organismos em dois filtros distintos, para que fosse possível a verificação e a explicação da taxa distinta em diferentes filtros.

**[0044]** Os dados obtidos com suportes de celulose e nitrocelulose mostraram-se diferentes em relação a taxa de transformantes quando testados para a mesma levedura, definindo dessa maneira, que o material empregado nessa invenção demonstra uma maior taxa de transformante do que o empregado em outros protocolos com leveduras, inclusive o de Bundock *et al*, 1999.

**[0045]** Assim, foi realizado o teste com membrana de nitrocelulose e suporte de celulose 100% para *Candida pseudotropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*. A primeira levedura apresentou um total de transformantes para a nitrocelulose de  $23 \times 10^1$  UFC transformadas, enquanto o suporte de celulose foi responsável pela transformação de  $5 \times 10^3$  UFC.

**[0046]** Já a levedura *S. cerevisiae*, também testada para os mesmos

suportes, apresentou  $97 \times 10^1$  UFC para nitrocelulose e  $42 \times 10^5$  para o filtro com 100% de celulose, o que nos mostra que, mesmo testando duas leveduras totalmente distintas, o suporte de celulose é muito mais eficiente que os demais, mesmo quando comparado com protocolos já existentes. Assim, pode-se definir que, na transformação por tal método, o que interfere nas elevadas taxas de transformantes é o tipo de suporte utilizado.

**[0047]** Nesse caso, o papel com 100% de celulose garante ao método apresentado nessa invenção elevadas proporções no número de OGMs obtidos, além de ser uma forma fácil e pouco onerosa de obtenção de produtos transformados. Além disso, foram testados papel Whatman® número 42 e número 1, os quais apresentam porosidade entre 2,5  $\mu\text{m}$  e 11  $\mu\text{m}$ , para verificação da capilaridade das células ao papel de continha maior teor de celulose.

**[0048]** Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Pequenas variações na forma de concretizá-la devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

### **Referências bibliográficas**

- Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJ (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO Journal 14: 3206-3214.

- Bundock P, Hooykaas PJ (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. PNAS 93:1613-1618.

- Bundock P, Mroczek K, Winkler AA, Steensma HY, Hooykaas PJ (1999) T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. Mol. Gen. Genet. 261: 115–121.

- Fraley RT, Horsch RB, Matzke A, Chilton MD, Chilton WS, Sanders PR (1984) In vitro transformation of petunia cells by an improved method of

cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Plant Mol Biol* 3:371–378

- Gardiner DM, Howlett BJ (2004) Negative selection using thymine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* 45: 249-255.

- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 16-37.

Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *PNAS* 98:1871-1876.

- Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* 48: 1-17.

### Reivindicações

1. Método de transformação de leveduras mediada por *Agrobacterium tumefaciens* **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) crescimento das células de levedura em um meio de cultura adequado;
- b) crescimento de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com um vetor de clonagem adequado;
- c) co-cultivo em um meio de cultura adequado das células de levedura da etapa a) com as células de *Agrobacterium tumefaciens* da etapa b) sobre um suporte sólido, o dito suporte sólido correspondendo a um filtro de celulose consistido de 100% de celulose e tendo porosidade escolhida dentre 2,5  $\mu\text{m}$  e 11  $\mu\text{m}$ .

2. Método de transformação de células **caracterizado** pelas leveduras serem selecionadas do grupo consistindo de: *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* IZ1339, *Saccharomyces cerevisiae* W303, *Candida albicans*, *Candida pseudotropicalis*, *Schwaniomyces castelli* IZ58-7, *Pichia fermentatis* IZ430, *Schizosacharomyces pombe* IZ871 e *Kluyveromyces fragilis* IZ610.

3. Método de transformação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo crescimento de a) e b) ser realizado sob temperatura de 22° a 28°C, sendo: i) crescimento por 16 a 24 horas seguido por ii) crescimento por 4 a 8 horas.

4. Método de transformação, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo crescimento das leveduras ocorrer em meio YEPD.

5. Método de transformação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo crescimento da *Agrobacterium* de b) ocorrer em meio MYA.

6. Método de transformação, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo meio compreender antibiótico adequado para seleção dos transformantes obtidos.

7. Método de transformação, de acordo com a reivindicação 1,

**caracterizado** pelo co-cultivo ser realizado de 1 a 5 dias.

8. Método de transformação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela taxa de transformantes ser calculada utilizando plaqueamento em gota.