



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

**(11) PI 0411182-6 B1**



**(22) Data do Depósito: 20/05/2004**

**(45) Data de Concessão: 20/08/2019**

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO E CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/82; C12N 15/29; A01H 5/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 22/05/2003 US 60/472,433.

**(73) Titular(es):** EVOGENE LTD..

**(72) Inventor(es):** HAGAI KARCHI; RAFAEL MEISSNER; GIL RONEN; EZEKIEL GOLAN.

**(86) Pedido PCT:** PCT IL2004000431 de 20/05/2004

**(87) Publicação PCT:** WO 2004/104162 de 02/12/2004

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 22/11/2005

**(57) Resumo:** "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA DE UMA PLANTA, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, POLIPEPTÍDIO ISOLADO E CÉLULA DE PLANTA". Compreende as seqüências de polinucleotídeo e métodos de utilização das mesmas para aumentar a tolerância de uma planta a estresses abióticos e/ou aumento da biomassa de uma planta.

"MÉTODO PARA AUMENTAR A  
TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO E CONSTRUTO DE  
ÁCIDO NUCLEICO"

A presente patente de  
5 privilégio de invenção se refere a métodos para aumentar a  
tolerância a estresse abiótico e/ou biomassa em plantas e,  
mais especificamente, a plantas que expressam genes exógenos  
de tolerância a estresse abiótico.

As condições de estresse  
10 abiótico (também chamado de "estresse ambiental") como  
salinidade, seca, inundação, temperatura abaixo do ideal e  
poluição tóxico-química, causam danos substanciais às  
plantas de agricultura. A maioria das plantas  
desenvolveu estratégias para se protegerem contra  
15 essas condições. Entretanto, se a gravidade e duração  
das condições de estresse forem muito intensas, os  
efeitos sobre o desenvolvimento, crescimento e  
reprodução da maioria das plantações serão profundos.  
Mais que isso, a maioria das plantações são muito  
20 suscetíveis a estresse abiótico (ABS) e por isso  
necessitam de condições ideais de crescimento para  
produções comerciais. A exposição contínua a estresse causa  
importantes alterações no metabolismo da planta que por fim  
levam à morte celular e consequentemente a perdas na produção.  
25 Assim, apesar das extensas pesquisas e o uso de medidas de  
proteção à colheita, as perdas em função das condições de  
estresse abiótico permanecem na casa dos bilhões de dólares  
anualmente (1,2).

P 1041102

52

O desenvolvimento de plantas tolerantes ao estresse é uma estratégia que tem o potencial de resolver ou mediar no mínimo alguns desses problemas. Entretanto, as estratégias de criação tradicional de plantas usadas para desenvolver novas linhas de plantas que exibem tolerância ao ABS são relativamente ineficientes, uma vez que elas são tediosas, consomem tempo e de resultados imprevisíveis. Além disso, os limitados recursos de germoplasma para tolerância a estresse e incompatibilidade cruzada entre espécies de planta com relação distante representam problemas significantes encontrados na criação convencional. Além disso, os processos celulares que levam à tolerância ao ABS são complexos pela natureza e envolvem múltiplos mecanismos de adaptação celular e inúmeras trilhas metabólicas (4-7).

Esforços de engenharia genética, com o objetivo de conferir tolerância ao estresse abiótico a colheitas transgênicas, são descritos na técnica anterior. Estudos de Apse e Blumwald (Curr Opin Biotechnol. 13:146-150, 2002), Quesada et al. (Plant Physiol. 130:951-963, 2002), Holmström et al. (Nature 379: 683-684, 1996), Xu et al. (Plant Physiol 110: 249-257, 1996), Pilon-Smits e Ebskamp (Plant Physiol 107: 125-130, 1995) e Tarczynski et al. (Science 259: 508-510, 1993) tentaram gerar plantas tolerantes a estresse.

Além disso, várias patentes e pedidos de patentes americanos também descrevem polinucleotídeos associados à tolerância ao estresse e seu

P 1041102

uso na geração de plantas tolerantes ao estresse. As  
patentes americanas nos. 5.296.462 e 5.356.816 descrevem a  
transformação de plantas com polinucleotídeos que codificam  
proteínas envolvidas na adaptação ao frio na *Arabidopsis*  
5 *thaliana* (agrião), para com isso promover a tolerância ao  
frio nas plantas transformadas.

A patente norte-americana nº  
6.670.528 descreve a transformação de plantas com  
polinucleotídeos que codificam polipeptídios que se ligam a  
10 elementos de resposta ao estresse, para com isso promover a  
tolerância das plantas transformadas ao estresse abiótico.

A patente norte-americana nº  
6.720.477 descreve a transformação de plantas com um  
polinucleotídeo que codifica uma transdução de sinal de  
15 proteína relacionada a estresse, capaz de aumentar a  
tolerância das plantas transformadas ao estresse abiótico.

Os pedidos de patente norte-  
americana nos. 09/938842 e 10/342224 descrevem os genes  
relacionados a estresse abiótico e seu uso para conferir  
20 tolerância ao estresse abiótico a plantas.

O pedido de patente norte-  
americana nº 10/231035 descreve a superexpressão da  
sulfurose do co-fator de molibdênio em plantas para com isso  
aumentar sua tolerância ao estresse abiótico.

25 Embora os estudos acima  
descritos foram no mínimo parcialmente bem-sucedidos em  
gerar plantas tolerantes ao estresse, permanece a  
necessidade de genes tolerantes ao estresse que possam ser

P1041102

74

utilizados para gerar plantas tolerantes de uma ampla variedade de condições de estresse abiótico.

Ao reduzir a presente invenção à prática, os presentes inventores identificaram, por meio de bioinformática e estudos laboratoriais, vários novos genes de tolerância ao estresse abiótico, que podem ser utilizados para aumentar a tolerância ao estresse abiótico e/ou biomassa em plantas.

De acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a tolerância de uma planta para um estresse abiótico. O método inclui a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno no mínimo 90% homólogo a um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 1-18.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a tolerância de uma planta a um estresse abiótico. O método inclui a expressão dentro da planta de um polipeptídeo exógeno incluindo uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 39-92.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a biomassa de uma planta. O método inclui a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno no mínimo 90% homólogo a um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 1-18.

De acordo com mais um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a

P 1041182

95

biomassa de uma planta. O método inclui a expressão dentro da planta de um polipeptídio exógeno incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 39-92.

5 De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma célula de plantas que compreenda um polinucleotídeo exógeno no mínimo 90% homólogo a um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 1-18.

10 De acordo com mais outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma célula de plantas que compreenda um polinucleotídeo exógeno que codifica um polipeptídio incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 39-92.

15 De acordo com mais um aspecto da presente invenção, é fornecido um construto de ácido nucléico, incluindo um polinucleotídeo no mínimo 90% homólogo a uma sequência de nucleotídeos selecionados do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 1-18 e um promotor capaz  
20 de direcionar a transcrição do polinucleotídeo em uma célula hospedeira.

De acordo com ainda mais um aspecto da presente invenção, é fornecido um construto de ácido nucléico, incluindo um polinucleotídeo codificando um  
25 polipeptídio que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 39-92 e um promotor capaz de direcionar a transcrição do polinucleotídeo em uma célula hospedeira.

P 1041182

De acordo com ainda outro  
aspecto da presente invenção, é fornecido um polipeptídio  
isolado, incluindo uma sequência de aminoácidos no mínimo  
90% homóloga à sequência de aminoácidos, codificada por um  
5 polinucleotídeo, selecionado do grupo que consiste de SEQ ID  
Nos: 1-18.

De acordo com mais outro  
aspecto da presente invenção, é fornecido um polipeptídio  
isolado incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada  
10 do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 39-92.

De acordo mais outras  
características em configurações preferidas da invenção  
acima descritas, a expressão é efetuada por (i) uma  
transformação de uma célula da planta com o polinucleotídeo  
15 exógeno; (ii) geração de uma planta madura da célula; e  
(iii) cultivo da planta madura sob condições adequadas  
para expressar o polinucleotídeo exógeno dentro da  
planta madura.

Ainda de acordo com outras  
20 características das configurações preferidas descritas, a  
transformação é efetuada pela introdução na célula de  
plantas de um construto de ácido nucléico incluindo o  
polinucleotídeo exógeno e no mínimo um promotor capaz de  
direcionar a transcrição do polinucleotídeo exógeno nas  
25 células de plantas.

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, o no  
mínimo um promotor é um promotor constitutivo.

P1041102

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, o  
promotor constitutivo é o promotor CaMV 35S.

57

Ainda de acordo com outras  
5 características das configurações preferidas descritas, o  
promotor constitutivo é o promotor At6669.

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, o no  
mínimo um promotor é um promotor induzível.

10 Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, o  
promotor induzível é um promotor induzível de estresse  
abiótico.

Ainda de acordo com outras  
15 características das configurações preferidas descritas, o no  
mínimo um promotor é um promotor específico de tecido.

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, a  
expressão é efetuada pela infecção da planta com um vírus  
20 incluindo o polinucleotídeo exógeno .

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, o  
vírus é um vírus avirulento.

Ainda de acordo com outras  
25 características das configurações preferidas descritas, o  
estresse abiótico é selecionado do grupo que consiste de  
salinidade, privação de água, temperaturas baixas,  
temperaturas altas, toxicidade por metais pesados,

P 1041102

anaerobiose, deficiência de nutrientes, excesso de  
nutrientes, poluição atmosférica e irradiação UV. 58

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, a  
5 planta é um planta dicotiledônea.

Ainda de acordo com outras  
características das configurações preferidas descritas, a  
planta é uma planta monocotiledônea.

Ainda de acordo com outras  
10 características das configurações preferidas descritas, a  
célula de plantas forma uma parte da planta.

A presente invenção aborda de  
maneira bem sucedida as falhas das configurações atualmente  
conhecidas fornecendo métodos de utilização de novos genes  
15 de tolerância a estresse abiótico para aumentar a tolerância  
das plantas a estresse abiótico e/ou biomassa.

A invenção é aqui descrita,  
somente por meio de exemplos, com referência aos desenhos em  
anexo. Fazendo referência específica aos desenhos em  
20 detalhe, é salientado agora que as especificidades mostradas  
são somente uma forma de exemplo e para fins de discussão  
ilustrada das configurações preferidas da presente invenção,  
e são apresentadas com o fim de fornecer o que é tido como a  
descrição mais útil e mais facilmente compreendida dos  
25 princípios e aspectos conceituais da invenção. Quanto a  
isso, não se pretende mostrar aspectos estruturais da  
invenção de forma mais detalhada do que o necessário para um  
entendimento fundamental da invenção, a descrição tomada em

P1041102

conjunto com os desenhos evidenciada para aqueles com conhecimento na técnica como as várias formas da invenção podem ser configuradas na prática.

99

5 a figura 1 é um fluxograma ilustrando um processo de identificação de genes putativos de plantas de tolerância a estresse de banco de dados de seqüência de ácido nucléico;

10 as figuras 2A e B são fotos ilustrando uma planta madura T2 transgênica *Arabidopsis thaliana* no estágio de florescência, expressando o transgene exógeno de luciferase do promotor At6669. A mesma planta é mostrada sob condições de luz normais (figura 2A) e no escuro (figura 2B). É observada forte iluminação indicativa de expressão de luciferase nos tecidos da flor e da raiz;

15 a figura 3 ilustra os pesos frescos de meios de plantas transgênicas T<sub>1</sub> *A. thaliana* cultivadas sob condições normais ou de estresse (irrigadas com solução de 0 ou 100 M NaCl, respectivamente).  
20 As plantas foram transformadas com genes putativos de tolerância ao estresse, ou com gene relator de luciferase (controle), posicionados sob o controle transcripcional do promotor At6669. Meios seguidos da mesma letra  
25 não são significativamente diferentes de acordo com um teste de uma via ANOVA T-Test;

a figura 4A ilustra os pesos frescos de meios de plantas T<sub>2</sub> *A. thaliana* cultivadas sob condições normais ou

de estresse (irrigadas com solução 0 ou 100 M NaCl, respectivamente). As plantas foram transformadas os genes putativos de tolerância ao estresse da presente invenção, ou com gene relator de luciferase (controle), posicionados sob o controle transcripcional do promotor 35S. Meios seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com um teste de uma via ANOVA T-Test;

10 a figura 4B ilustra os pesos frescos de meios de plantas  $T_2$  *A. thaliana* cultivadas sob condições normais ou de estresse (irrigados com solução 0 ou 100 M NaCl, respectivamente). As plantas foram transformadas com os genes putativos de tolerância ao estresse da presente invenção, ou com o gene relator de luciferase (controle), posicionados sob o controle transcripcional do promotor At6669. Meios seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com um teste de uma via ANOVA T-Test; e

20 a figura 5 ilustra porcentagem relativa de peso fresco de plantas transgênicas  $T_1$  *A. thaliana* cultivadas sob condições de estresse de salinidade (irrigadas com solução de 100 mM NaCl), se comparada com plantas similares cultivadas sob condições normais (irrigadas somente com água). As plantas foram transformadas com os genes putativos de tolerância ao estresse da presente

P1041182

invenção, ou com gene relator de luciferase (controle), posicionados sob o controle transcripcional do promotor At6669.

61

A presente invenção é de  
5 métodos para aumentar a tolerância das plantas ao estresse  
abiótico e/ou biomassa utilizando novos genes de tolerância  
a estresse abiótico e de plantas que exibem aumento de  
tolerância a condições de estresse e/ou maior capacidade de  
acumular biomassa.

10 Os princípios e operação da  
presente invenção podem ser mais bem compreendidos com  
referência aos desenhos e descrições em anexo.

Antes de explicar no mínimo uma  
das configurações em detalhes, deve ser entendido que a  
15 invenção não se limita em sua aplicação aos detalhes de  
construção e ao arranjo dos componentes estabelecidos na  
descrição a seguir ou ilustrados nos desenhos. A invenção  
comporta outras configurações ou várias outras formas de ser  
praticada ou conduzida. Além disso, deve ser entendido que a  
20 fraseologia e terminologia aqui empregada é para fins de  
descrição e não devem ser entendidas como limitantes.

Ao reduzir a presente invenção  
à prática, os presentes inventores, enquanto empregavam as  
técnicas de bioinformática, identificaram seqüências de  
25 polinucleotídeo que codificam proteínas putativas de  
tolerância ao estresse abiótico (ABST) (Exemplo 1). As  
seqüências selecionadas foram isoladas (Exemplo 2), clonadas  
em vetores de expressão (Exemplos 3 e 4) e introduzidas em

P 1041132

62

plantas *Arabidopsis thaliana* (Exemplo 5). Essas plantas, que são cultivadas sob condições de estresse por salinidade, ou sob condições normais, exibiram biomassa significativamente maior se comparadas a plantas similares que não portam os genes exógenos ABST (Exemplo 6).

Assim sendo, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a tolerância de uma planta a um estresse abiótico e/ou biomassa da planta. O método inclui a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno no mínimo 70% homólogo, preferivelmente no mínimo 80% homólogo, mais preferivelmente no mínimo 85% homólogo, mais preferivelmente no mínimo 90% homólogo a um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 1-18. De forma alternativa, o polinucleotídeo exógeno da presente invenção codifica o polipeptídeo com uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo que consiste de SEQ ID Nos: 39-92.

A expressão "estresse abiótico" conforme aqui empregada se refere a qualquer efeito adverso sobre o metabolismo, crescimento, reprodução e/ou viabilidade de uma planta. Coerentemente, o estresse abiótico pode ser induzido por condições de crescimento ambiental sub-ideais como, por exemplo, salinidade, privação de água, inundação, temperaturas altas ou baixas, toxicidade por metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutrientes, poluição atmosférica ou irradiação UV.

A expressão "tolerância a estresse abiótico" conforme aqui empregada se refere à

P 1041132

63

capacidade da planta de suportar um estresse abiótico sem sofrer uma alteração substancial no metabolismo, crescimento, produtividade e/ou viabilidade.

Uma planta adequada para uso com o método da presente invenção pode ser qualquer planta monocotiledônea ou dicotiledônea incluindo, mas não se limitando a, milho, trigo, raramente, centeio, aveia, arroz, soja, amendoim, ervilha, lentilha e alfafa, algodão, colza, canola, pimenta, girassol, batata, tabaco, tomate, berinjela, eucalipto, uma árvore, uma planta ornamental, um capim resistente e uma colheita de forragem.

Conforme aqui utilizado, o termo "polinucleotídeo exógeno" se refere a uma sequência de ácido nucléico que não é naturalmente expressada dentro da planta mas que, quando introduzida na planta de forma estável ou transiente, produz no mínimo um produto de polipeptídio.

A expressão do polinucleotídeo exógeno da presente invenção dentro da planta pode ser efetuada pela transformação de uma ou mais células da planta com o polinucleotídeo exógeno, seguida pela geração da planta madura das células transformadas e o cultivo da planta madura sob condições estáveis para expressar o polinucleotídeo exógeno dentro da planta madura.

Preferivelmente, a transformação é efetuada pela introdução na célula de plantas de um construto de ácido nucléico que inclui o polinucleotídeo exógeno da presente invenção e no mínimo um

64



5

P 1041102

5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680;  
5.268.463; e 5.608.142.

65

Os promotores específicos de tecido adequados incluem, mas não se limitam a, promotores  
5 específicos de folhas conforme descrito, for exemplo, o de Yamamoto et al., Plant J. 12:255-265, 1997; Kwon et al., Plant Physiol. 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., Plant Cell Physiol. 35:773-778, 1994; Gotor et al., Plant J. 3:509-18, 1993; Orozco et al., Plant Mol. Biol. 23:1129-1138, 1993; e  
10 Matsuoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:9586-9590, 1993.

Os promotores induzíveis a estresse abiótico adequados incluem, mas não se limitam a, promotor induzíveis a sal como RD29A (Yamaguchi-Shinozaki et al., Mol. Gen. Genet. 236:331-340, 1993); promotor induzíveis a seca como o promotor do gene rab17 do milho (Pla et. al., Plant Mol. Biol. 21:259-266, 1993), promotor do gene rab28 do milho (Busk et. al., Plant J. 11:1285-1295, 1997) e o promotor do gene Ivr2 de milho (Pelleschi et. al.,  
20 Plant Mol. Biol. 39:373-380, 1999); e promotores induzíveis a calor como o promotor de calor hsp80 do tomate (patente norte-americana nº 5.187.267).

O construto de ácido nucléico da presente invenção preferivelmente inclui também um  
25 marcador selecionável adequado e/ou uma origem de replicação. Preferivelmente, o construto de ácido nucléico utilizado é um vetor de transferência, que pode se propagar tanto em E. coli (em que o construto compreenda um marcador

P 1041182

66

selecionável adequado e origem de replicação) como ser compatível com a propagação em células. O construto de acordo com a presente invenção pode ser, por exemplo, um plasmídio, um bacmid, um phagemid, um cosmídeo, um fago, um vírus ou um cromossomo artificial.

O construto de ácido nucléico da presente invenção pode ser utilizado para transformar de forma estável ou transiente as células de plantas. Em transformação estável, o polinucleotídeo exógeno da presente invenção é integrado ao genoma da planta e como tal representa um traço estável e herdado. Em transformação transiente, o polinucleotídeo exógeno é expresso pela célula transformada, mas é integrado ao genoma e como tal representa um traço transiente.

Há vários métodos para introdução de genes estranhos tanto nas plantas monocotiledôneas como nas dicotiledôneas (Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant Mol. Biol. (1991) 42:205-225; Shimamoto et al., Nature (1989) 338:274-276).

Os principais métodos para causar a integração estável do DNA exógeno no DNA genômico da planta incluem duas abordagens principais:

(i) transferência de genes mediada por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee e Rogers in Cell Culture e Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in Plant Biotechnology, eds.

P1041182

67

Kung, S. e Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

- (ii) Levantamento direto de DNA: Paszkowski et al., in Cell Culture e Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; incluindo métodos para o levantamento direto de DNA em protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074. Levantamento de DNA induzido por choque elétrico breve de células de plantas: Zhang et al. Plant cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm et al. Nature (1986) 319:791-793. Injeção de DNA em células ou tecidos de plantas por bombardeamento de partículas, Klein et al. Bio/Technology (1988) 6:559-563; McCabe et al. Bio/Technology (1988) 6:923-926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79:206-209; pelo uso de sistemas micro-pipetas: Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus e Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79:213-217; transformação de fibras de vidro ou carboneto de silício de culturas de células, embriões ou tecido caloso, patente norte-americana nº 5.464.765 ou pela incubação direta de DNA com pólen germinante, DeWet et al. in Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. e Mantell, S. H. e Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1986) 83:715-719.

O sistema Agrobacterium inclui o uso de vetores de plasmídeo que contêm segmentos de DNA definidos que se integram ao DNA genômico de planta. Os

P1041182

68

métodos de inoculação do tecido da planta variam dependendo da espécie da planta e do sistema de fornecimento do Agrobacterium. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco de folha que pode ser realizado com qualquer tecido de planta que forneça uma boa fonte para iniciação da diferenciação de toda a planta. Horsch et al. in Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Uma abordagem suplementar emprega o sistema de fornecimento de Agrobacterium em combinação com infiltração a vácuo. O sistema Agrobacterium é especialmente viável na criação das plantas transgênicas dicotiledôneas.

Há vários métodos de transferência de DNA direto nas células de plantas. Na eletroporação, os protoplastos são rapidamente expostos a um forte campo elétrico. Na micro-injeção, o DNA é injetado mecanicamente diretamente nas células usando micro-pipetas muito pequenas. No bombardeamento de micro-partículas, o DNA é adsorvido em micro-projéteis como cristais de sulfato de magnésio ou partículas de tungstênio, e os micro-projéteis são fisicamente acelerados em tecidos de células ou plantas.

É exercida a propagação de planta de transformação estável a seguir. O mais comum método de propagação de planta é pela semente. A regeneração por propagação de semente, entretanto, tem a deficiência de que em função de que a heterozigosidade ocorre em função da falta de uniformidade na colheita, uma vez que as sementes são produzidas pelas plantas de acordo com as variações

P1041182

69

genéticas governadas pelas regras Mendelianas. Basicamente, cada semente é diferente geneticamente e cada uma irá crescer de acordo com suas características. Portanto, é preferível que a planta transformada seja produzida de modo

5 que a planta regenerada os traços e características idênticos da planta-mãe transgênica. Portanto, é preferível que a planta transformada seja regenerada pela micro-propagação que fornece uma rápida, consistente reprodução das plantas transformadas.

10 A micro-propagação é um processo para cultivar plantas de nova geração a partir de um único pedaço de tecido que tenha sido extirpado a partir de uma planta-mãe ou cultivo selecionado. Esse processo permite a reprodução em massa das plantas com a expressão de

15 tecido preferido da proteína de fusão. As plantas de nova geração que são produzidas são geneticamente idênticas e têm todas as características da planta original. A micro-propagação permite que a produção em massa de material de planta de qualidade em um curto período de tempo e oferece

20 uma rápida multiplicação dos cultivos selecionados na preservação das características da planta original transgênica ou transformada. As vantagens da clonagem de plantas são a velocidade de multiplicação da planta e a qualidade e uniformidade das plantas produzidas.

25 A micro-propagação é um procedimento de múltiplos estágios que exige a alteração do meio de cultura ou condições de crescimento entre os estágios. Com isso, o processo de micro-propagação envolve

P1041102

70

quatro estágios básicos: Estágio um, cultura inicial de tecido; estágio dois, multiplicação da cultura do tecido; estágio três, diferenciação e formação de planta; e estágio quatro, cultura em estufa e endurecimento. Durante o estágio um, cultura inicial de tecido, a cultura de tecido é estabelecida e certificada livre de contaminantes. Durante o estágio dois, a cultura inicial de tecido é multiplicada até que um número suficiente de amostras de tecido seja produzido para atingir as metas de produção. Durante o estágio três, as amostras de tecidos cultivadas no estágio dois são divididas e cultivadas em plantinhas individuais. No estágio quatro, as plantinhas transformadas são transferidas para uma estufa para endurecerem, onde a tolerância das plantas à luz é gradualmente aumentada para que possam ser cultivadas em ambiente natural.

Preferivelmente, as plantas maduras transformadas geradas conforme acima descrito são ainda selecionadas pela tolerância a estresse abiótico. Coerentemente, as plantas transformadas e não-transformadas (tipo selvagem) são expostas a uma condição de estresse abiótico, como privação de água, temperatura abaixo da ideal, deficiência de nutrientes, ou preferivelmente uma condição de estresse de sal. O estresse de sal pode ser efetuada de várias formas, como, por exemplo, irrigando as plantas com uma solução hiperosmótica, cultivando de forma hidropônica as plantas em uma solução de crescimento hiperosmótico (como a solução Hoagland), ou pelo cultivo das plantas em um meio de crescimento hiperosmótico (como o meio

P1041102

71

MS). Uma vez que as diferentes plantas variam consideravelmente quanto à tolerância à salinidade, a concentração de sal na água de irrigação, solução de crescimento ou meio de crescimento é preferivelmente ajustado de acordo com as características específicas do cultivo de planta cultivar ou variedade específica, de modo a infligir um efeito leve ou moderado sobre a fisiologia e/ou morfologia das plantas (para diretrizes e para concentração adequada, favor consultar Bernstein e Kafkafi, Root Growth Under Salinity Stress In: Plant Roots, The Hidden Half 3ª ed. Waisel Y, Eshel A e Kafkafi U. (editores) Marcel Dekker Inc., Nova Iorque, 2002, e suas referências). Após a exposição à condição de estresse, as plantas são frequentemente monitoradas sob efeitos fisiológicos e/ou morfológicos substanciais aparecem em plantas do tipo selvagem. Em seguida, as plantas transformadas que não exibem efeitos fisiológicos e/ou morfológicos substanciais, ou que exibem biomassa maior do que as plantas do tipo selvagem são identificadas como plantas tolerantes ao estresse abiótico.

Embora a transformação estável seja presentemente preferida, a transformação transiente das células de folhas, células meristemáticas ou a planta toda são também conjecturadas pela presente invenção.

A transformação transiente pode ser efetuada através de métodos de transferência de DNA direto DNA acima descritos ou por infecção viral usando os vírus modificados de plantas.

P 1041182

12

Os vírus que foram mostrados como úteis para a transformação de hospedeiros de planta incluem CaMV, TMV e BV. A transformação de plantas usando vírus de plantas é descrito na patente norte-americana nº 5 4.855.237 (BGV), EP-A 67.553 (TMV), Pedido Publicado de Patente Japonesa No. 63-14693 (TMV), EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); e Gluzman, Y. et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, pp. 172-189 (1988). As partículas 10 de pseudovírus para uso na expressão de DNA estrangeiro em muitos hospedeiros, incluindo plantas, é descrito em WO 87/06261.

Preferivelmente, o vírus da presente invenção é avirulento e com isso é incapaz de 15 causar sintomas graves como taxa de crescimento reduzido; mosaico; manchas em anel; enrolamento da folha; amarelamento; listras; formação de pústulas; formação de tumor, e formação de sulcos. Um vírus avirulento adequado pode ser um vírus avirulento que ocorre naturalmente ou um 20 vírus atenuado artificialmente. A atenuação de vírus pode ser efetuada utilizando-se métodos bem conhecidos na técnica incluindo, mas não se limitando a, aquecimento sub-letal, tratamento químico ou por técnicas direcionadas de metagênese como as descritas, por exemplo, por Kurihara e 25 Watanabe (Molecular Plant Pathology 4:259-269, 2003), Gal-on et al. (1992), Atreya et al. (1992) e Huet et al. (1994).

As cepas de vírus adequadas podem ser obtidas de fontes disponíveis como, por exemplo, a

P1041102

73

American Type Culture Collection (ATCC) ou por isolamento de plantas infectadas. A isolamento de vírus de tecidos de planta infectada pode ser efetuada por técnicas bem conhecidas como a descrita, por exemplo, por Foster e Tatlor, Eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998. De forma resumida, acredita-se que os tecidos de uma planta infectada contenham uma alta concentração de vírus adequado, preferivelmente folhas e pétalas de flores novas, moídos em uma solução tampão (como por exemplo solução de tampão de fosfato) para produzir uma seiva infectada por vírus que pode ser usada nas inoculações a seguir.

A construção de vírus de RNA de plantas para introdução e expressão de seqüências não-virais de polinucleotídeo exógeno em plantas é demonstrada pelas referências acima assim como em Dawson, W. O. et al., Virology (1989) 172:285-292; Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6:307-311; French et al. Science (1986) 231:1294-1297; e Takamatsu et al. FEBS Letters (1990) 269:73-76.

Quando o vírus for um vírus de DNA, podem ser feitas modificações adequadas ao próprio vírus. Alternativamente, o vírus podem ser primeiramente clonado em um plasmídeo bacteriano para facilitar a construção do vetor viral desejado com o DNA estrangeiro. O vírus pode ser extirpado do plasmídeo. Se o vírus for um vírus de DNA, uma origem bacteriana de replicação pode ser ligada ao DNA viral, que é então replicado pela bactéria. A

P 1041132

74

transcrição e translação desse DNA irão produzir a proteína de revestimento que irá encapsidar o DNA viral. Se o vírus for um vírus de RNA, o vírus é geralmente clonado como um cDNA e inserido em um plasmídio. O plasmídio é então usado para fazer todas as construções. O vírus de RNA é então produzido pela transcrição da sequência viral do plasmídio e translação dos genes virais para produzir a(s) proteína(s) revestida(s) que encapsida(m) o RNA viral.

A construção de vírus de RNA de plantas para introdução e expressão em plantas de sequências não-virais de polinucleotídeo exógeno como as incluídas no construto da presente invenção é demonstrada pelas referências acima assim como na patente norte-americana nº 5.316.931.

Em uma configuração, é fornecido um polinucleotídeo viral de planta em que a sequência de codificação da proteína de revestimento nativa foi deletada de um polinucleotídeo viral, uma sequência de codificação da proteína de revestimento não-nativa e um promotor não-nativo, preferivelmente o promotor sub-genômico da sequência de codificação da proteína de revestimento não-nativa, hábil para expressão no hospedeiro da planta, embalagem do polinucleotídeo viral da planta recombinante e garantir uma infecção sistêmica do hospedeiro pelo polinucleotídeo viral da planta recombinante, foi inserido. Alternativamente, o gene de proteína de revestimento pode ser inativado pela inserção da sequência de codificação da proteína de revestimento não-nativa em si, de modo que seja

P 1041102

25

produzida uma proteína. O polinucleotídeo viral de planta recombinante pode conter um ou mais promotores sub-genômico não-nativos extras. Cada promotor sub-genômico não-nativo é capaz de transcrever ou expressar genes adjacentes genes ou

5 seqüências de polinucleotídeo no hospedeiro de planta e incapaz de recombinação uns com os outros e com promotores sub-genômico nativos. As seqüências de polinucleotídeo estrangeiras (não-nativas) podem ser inseridas adjacentes ao promotor nativo sub-genômico viral de planta ou o promotor

10 nativo e não-nativo sub-genômico viral de plantas se mais de uma seqüência de polinucleotídeo for incluída. As seqüências de polinucleotídeo não-nativas são transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle do promotor sub-genômico para produzir os produtos desejados.

15 Em uma segunda configuração, um polinucleotídeo viral de planta recombinante é fornecido da mesma forma que na primeira configuração exceto pelo fato de que a seqüência de codificação de proteína de revestimento nativa é colocada adjacente a um dos promotor sub-genômico

20 de proteína de revestimento não-nativa em vez de uma seqüência de codificação de proteína de revestimento não-nativa.

Em uma terceira configuração, um polinucleotídeo viral de planta recombinante é fornecido

25 caracterizado pelo fato de que o gene de proteína de revestimento nativa seja adjacente a seu promotor sub-genômico e um ou mais promotores sub-genômico não-nativos sejam inseridos ao polinucleotídeo viral. Os promotores sub-

P 1041102

76

genômico não-nativos inseridos são capazes de transcrever ou expressar genes adjacentes em um hospedeiro de planta e não são capazes de recombinação uns com os outros e com promotores sub-genômico nativos. As seqüências de polinucleotídeo não-nativas podem ser inseridas adjacentes aos promotores sub-genômico de planta viral não nativos de modo que as seqüências sejam transcritas ou expressadas na planta hospedeira sob controle dos promotores sub-genômico para produzir o produto desejado.

10 Em uma quarta configuração, um polinucleotídeo viral de planta recombinante é fornecido da mesma forma que na terceira configuração exceto pelo fato de que a seqüência de codificação de proteína de revestimento nativa é substituída por uma seqüência de codificação de  
15 proteína de revestimento não-nativa.

Os vetores virais são encapsidados pelas proteínas de revestimento codificadas pelo polinucleotídeo viral de planta recombinante para produzir um vírus de planta recombinante. O polinucleotídeo  
20 viral de planta recombinante ou vírus de planta recombinante é usado para infectar as plantas hospedeiras adequadas. O polinucleotídeo viral de planta recombinante é capaz de replicação no hospedeiro, alastrar-se sistemicamente no hospedeiro, e de transcrição ou expressão de genes estranhos  
25 (polinucleotídeo exógeno) no hospedeiro para produzir a proteína desejada.

Técnicas para inoculação de vírus a plantas podem ser encontradas em Foster e Taylor,

74

5

10

15

20

25

P1041182

78

derivado do genoma do cloroplasto. Além disso, o polinucleotídeo exógeno inclui um marcador selecionável, que serve por meio de procedimentos de seleção sequencial para averiguar se todas ou substancialmente todas as cópias dos genomas de cloroplasto que seguem essa seleção irão incluir o polinucleotídeo exógeno. Mais detalhes referentes a essa técnica serão encontrados nas patentes americanas nos. 4.945.050; e 5.693.507 que são aqui incorporadas por meio de referência. Um polipeptídio pode, dessa forma, ser produzido pelo sistema de expressão da proteína do cloroplasto e se integrar à membrana interna do cloroplasto.

Uma vez que a tolerância a estresse abiótico em plantas pode envolver genes múltiplos atuando de forma aditiva ou em sinergia (consulte, como exemplo, Quesda et al., Plant Physiol. 130:951-063, 2002), a presente invenção também conjectura a expressão de uma pluralidade de polinucleotídeos exógenos em uma única planta hospedeira para com isso atingir uma tolerância maior ao estresse abiótico.

A expressão de uma pluralidade de polinucleotídeos exógenos em uma única planta hospedeira pode ser efetuada pela co-introdução de múltiplos construtos de ácido nucléico cada um incluindo um diferente polinucleotídeo exógeno, em uma única célula de plantas. A célula transformada pode ser então regenerada em uma planta madura usando os métodos acima descritos.

Alternativamente, a expressão de uma pluralidade de polinucleotídeos exógenos em uma única

P1041182

79

planta hospedeira pode ser efetuada pela co-introdução em uma única célula de planta de um único construto de ácido nucléico incluindo uma pluralidade de diferentes polinucleotídeos exógenos. Esse construto pode ser desenhado com uma única seqüência de promotor que pode transcrever uma mensagem policistrônica incluindo todas as diferentes seqüências de polinucleotídeo exógeno. Para possibilitar a co-translação dos diferentes polipeptídios codificados pela mensagem policistrônica, as seqüências de polinucleotídeo podem ser interligadas por meio de uma seqüência do local de entrada de ribossomos internos (IRES) que facilita a translação de seqüências de polinucleotídeo posicionadas abaixo na seqüência de IRES. Nesse caso, uma molécula de RNA policistrônico transcrito codificando os diferentes polipeptídios acima descritos serão transladados da ponta 5' tampada e das duas seqüências internas IRES da molécula de RNA policistrônico para com isso produzir na célula todos os diferentes polipeptídios. Alternativamente, o construto pode incluir várias seqüências promotoras cada uma ligada a uma diferente seqüência de polinucleotídeo exógeno.

A célula de plantas transformada com o construto incluindo uma pluralidade de diferentes polinucleotídeos exógenos pode ser regenerada em uma planta madura, usando os métodos descritos acima.

Alternativamente, a expressão de uma pluralidade de polinucleotídeos exógenos em uma única planta hospedeira pode ser efetuada pela introdução de diferentes construtos de ácido nucléico, incluindo

P 1041182

80

diferentes polinucleotídeos exógenos, em uma pluralidade de plantas. As plantas regeneradas transformadas podem ser misturadas e a resultante progenia selecionada para uma maior característica de tolerância a estresse abiótico e/ou

\* 5 biomassa, usando técnicas convencionais de criação de plantas.

Assim sendo, o presente pedido fornece métodos de utilização de novos genes de tolerância a estresse abiótico para aumentar a tolerância ao estresse

10 abiótico e/ou biomassa em uma ampla faixa de plantas econômicas, de forma segura e de custo efetivo.

Objetivos; vantagens, e características novas extras da presente invenção se tornarão evidentes àqueles com conhecimento básico da

15 técnica mediante exame dos exemplos a seguir, que não pretendem ser limitantes. Adicionalmente, cada um das várias configurações e aspectos da presente invenção conforme acima delineado e conforme clamado na seção de reivindicações a seguir encontra suporte experimental nos exemplos a seguir.

20 EXEMPLOS

É feita agora referência aos exemplos a seguir, que juntos com as descrições acima, ilustram uma invenção de forma não-limitante.

Geralmente, a nomenclatura aqui

25 empregada e os procedimentos laboratoriais utilizados na presente invenção incluem técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas e recombinantes de DNA. Tais técnicas são amplamente explicadas na literatura. Consulte, for exemplo,

P1041182

81

"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nova Iorque (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nova Iorque; Birren et al. (eds) "Genoma Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque (1998); as metodologias conforme estabelecidas nas patentes americanas nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic e Clinical Immunology" (8ª Edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell e Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman e Co., Nova Iorque (1980); os imunoensaios disponíveis são amplamente descritos na literatura de patentes e científica; consulte, por exemplo, as patentes americanas nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 e 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney,

R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos dos quais são aqui incorporados por referência como se totalmente aqui colocados. Outras referências gerais são fornecidas ao longo deste documento. Os procedimentos aqui colocados são tidos como amplamente divulgados na técnica e fornecidos para a conveniência do leitor.

A menos que de outra forma definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que seria compreendido por alguém com conhecimento básico da técnica à qual esta invenção se refere. Embora os métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos possam ser usados na prática ou nos testes da presente invenção, são descritos a seguir os métodos e materiais adequados.

#### EXEMPLO 1

Identificação de genes putativos de tolerância a estresse abiótico

Os genes putativos de tolerância a estresse abiótico (ABST) foram selecionados from de bancos de dados de NCBI de sequência expressa de tomate (ESTs) e cDNAs. As seqüências de banco de dados foram agrupadas e montadas usando-se o software LEADS™ (Compugen).

O agrupamento resultou em mais de 20.000 agrupamentos, cada um representando um gene diferente. Foi compilado um sumário de perfis de expressão para cada grupo acumulando-se todas as palavras-chave incluídas nos registros de seqüências que  
5 compreendam o grupo. Os grupos então passaram por triagem para que incluíssem polinucleotídeos que se originam de bibliotecas identificadas por palavras-chave referentes ao ABST. Os grupos selecionados foram então filtrados para excluir qualquer grupo cluster que incluísse mais de 100  
10 ESTs por grupo e/ou qualquer grupo em que menos de 50% das seqüências forem anotadas por palavras-chave referentes a ABST.

Os genes de plantas ABST da técnica anterior foram identificados a partir das  
15 publicações de Quesada et al. (Plant Physiol. 130:951-963, 2002); Apse e Blumwald (Curr Opin Biotechnol. 13:146-150, 2002); Rontein et al. (Metab Eng 4:49-56, 2002); e suas referências. Os genes de plantas ABST conhecidos foram  
~ alinhados com as seqüências de ácido nucléico de tomate  
20 agrupadas, usando o programa BLAST. As seqüências de tomate com um valor e-score menor do que 5 foram identificadas como ortólogas de ABST. Genes de tomate ABST extras da técnica anterior foram identificados buscando-se os registros de seqüência de tomate agrupados usando-se as palavras-chave  
25 "raiz", "bile de coroa", "nutriente", "calo", "doença", "patógeno", "extrator" e "pseudomonas".

Por fim, todos os genes ABST da técnica anterior identificados foram combinados (por

alinhamento de sequência usando o software BLAST) com o conjunto de saída de grupos de gene de tomate, selecionado conforme acima descrito. Conseqüentemente, cerca de 40% dos genes selecionados no conjunto de saída dos grupos que se combinarem com os genes ABST da técnica anterior provaram ser genes ABST conhecidos, indicando que os genes remanescentes dos grupos selecionados são potencialmente capazes de aumentar a tolerância a estresse abiótico em plantas.

10 As seqüências de polinucleotídeo selecionadas (Tabela 1a) foram analisadas quanto à presença de ORFs usando Vector NTI suite (InforMax, U.K.) versão 6 (Hasting Software, Inc: [www.generunner.com/](http://www.generunner.com/)). Os ORFs identificados em cada uma dessas seqüências de polinucleotídeo foram comparados às seqüências de banco de dados Genbank, usando-se Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)); o ORF que mostrou a maior homologia a uma seqüência ou seqüências de GenBank foi mapeado para identificar um códon de início de ATG. A posição do códon de início de ATG desse ORF foi então comparada à da seqüência de polinucleotídeo a fim de verificar se cada uma das dezoito seqüências aqui descritas inclui um ORF de tamanho completo e um códon de início de ATG (assim qualifica-se como um "gene putativo de ABST").

25 Tabela 1a

Genes putativos de ABST

| ABST No. | SEQ ID No. |
|----------|------------|
| 1        | 1          |
| 3        | 2          |
| 5        | 3          |

P1041102

85

| Continuação da Tabela 1a |    |
|--------------------------|----|
| 6                        | 4  |
| 10                       | 5  |
| 11                       | 6  |
| 12                       | 7  |
| 19                       | 8  |
| 22                       | 9  |
| 24                       | 10 |
| 26                       | 11 |
| 27                       | 12 |
| 36                       | 13 |
| 37                       | 14 |
| 39_T0                    | 15 |
| 39_T1                    | 16 |
| 49_T0                    | 17 |
| 49_T1                    | 18 |

Os homólogos de polipeptídio ABST foram identificados a partir dos bancos de dados NCBI usando-se software BLAST (Tabela 1b).

Tabela 1b

## 5 Homólogos de ABST

| Gene Putativo de<br>ABST SEQ ID No. | Homólogo de<br>Polipeptídio ABST<br>Nº de Adesão NCBI | Homólogo de<br>Polipeptídio ABST<br>SEQ ID No. | Homologia<br>(%) |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------|
| 1                                   | BAA96366                                              | 39                                             | 98               |
| 1                                   | AAS47510                                              | 40                                             | 98               |
| 1                                   | NP_567151                                             | 41                                             | 97               |
| 1                                   | NP_567104                                             | 42                                             | 96               |
| 1                                   | AAK55664                                              | 43                                             | 96               |
| 1                                   | P46298                                                | 44                                             | 97               |
| 1                                   | T01338                                                | 45                                             | 96               |
| 1                                   | T47888                                                | 46                                             | 95               |
| 1                                   | BAD09465                                              | 47                                             | 92               |
| 1                                   | Q05761                                                | 48                                             | 91               |
| 1                                   | BAD09464                                              | 49                                             | 88               |
| 1                                   | CAA79496                                              | 50                                             | 84               |
| 1                                   | EAJ94592                                              | 51                                             | 85               |
| 4                                   | NP_188036                                             | 52                                             | 76               |
| 4                                   | NP_035977                                             | 53                                             | 70               |
| 4                                   | XP_342608                                             | 54                                             | 69               |
| 4                                   | T09295                                                | 55                                             | 60               |
| 4                                   | NP_564717                                             | 56                                             | 59               |
| 4                                   | AAM63624                                              | 57                                             | 59               |
| 9                                   | P37707                                                | 58                                             | 93               |

P1041102

86

| Continuação da Tabela 1b |           |    |    |
|--------------------------|-----------|----|----|
| 9                        | CAD37200  | 59 | 81 |
| 9                        | CAA04664  | 60 | 78 |
| 9                        | AAM64572  | 61 | 77 |
| 9                        | NP_189345 | 62 | 77 |
| 9                        | NP_974979 | 63 | 60 |
| 13                       | AAC49992  | 64 | 88 |
| 13                       | T10804    | 65 | 87 |
| 13                       | AAL38357  | 66 | 87 |
| 13                       | NP_188245 | 67 | 87 |
| 13                       | NP_193465 | 68 | 87 |
| 13                       | AAG44945  | 69 | 86 |
| 13                       | T07819    | 70 | 86 |
| 13                       | T12632    | 71 | 86 |
| 13                       | CAC39073  | 72 | 86 |
| 13                       | T01648    | 73 | 86 |
| 13                       | AAF90121  | 74 | 86 |
| 13                       | S48116    | 75 | 86 |
| 13                       | AAO86710  | 76 | 86 |
| 13                       | T14002    | 77 | 85 |
| 13                       | T14001    | 78 | 85 |
| 13                       | T48886    | 79 | 85 |
| 13                       | T14314    | 80 | 85 |
| 13                       | P33560    | 81 | 85 |
| 13                       | P21653    | 82 | 85 |
| 13                       | T14000    | 83 | 85 |
| 13                       | T48884    | 84 | 85 |
| 13                       | P24422    | 85 | 85 |
| 13                       | AAB53329  | 86 | 85 |
| 14                       | NP_200279 | 87 | 67 |
| 14                       | AAM64276  | 88 | 67 |
| 14                       | AAO72577  | 89 | 66 |
| 14                       | NP_175518 | 90 | 64 |
| 14                       | BAC78588  | 91 | 64 |
| 14                       | BAD03011  | 92 | 62 |

## EXEMPLO 2

Isolamento de genes putativos

de tolerância a ABS

O RNA foi extraído do tecido de  
 5 raiz e folhas de tomate de 4 semanas de idade usando-se o  
 Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc), após o  
 protocolo fornecido pelo fabricante

P 1041102

87

(www.mrcgene.com/tri.htm). As moléculas complementares de DNA foram produzidas a partir do mRNA extraído usando-se M-MuLV transcriptase reversa (RT) enzima (Roche) e T<sub>16</sub>NN DNA primeiro, de acordo com as instruções do fabricantes. As

5 seqüências de cDNA estabelecidas nas SEQ ID Nos: 1,4,8-9 e

12-14, foram amplificadas por PCR usando-se os primeiros descritos na Tabela 2 a seguir, com enzima de polimerase de DNA de leitura de prova PFU (Promega-

10 www.promega.com/pnotes/68/7381\_07/7381\_07.html), após o protocolo fornecido pelo fabricante. Os locais adicionais de endonuclease de restrição foram adicionados à primeira ponta 5' de cada primeiro para facilitar a clonagem dos genes putativos de tolerância a ABS em vetores binários.

Tabela 2

15 Prímeros de PCR usados para amplificar os genes putativos de tolerância a ABS (ABST)

| Genes de ABST<br>SEQ ID Nº | Prímero Antecipado<br>SEQ ID Nº | Prímero Reverso<br>SEQ ID Nº | Local de restrição<br>acima | Local de restrição<br>abaixo |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1                          | 21                              | 22                           | BamH1                       | SacI                         |
| 4                          | 23                              | 24                           | BamH1                       | SacI                         |
| 8                          | 25                              | 26                           | BamH1                       | SacI                         |
| 9                          | 27                              | 28                           | XbaI                        | SmaI                         |
| 12                         | 29                              | 30                           | BamH1                       | SacI                         |
| 13                         | 31                              | 32                           | BamH1                       | SacI                         |
| 14                         | 33                              | 34                           | BamH1                       | SmaI                         |

## EXEMPLO 3

Clonagem dos genes putativos de

ABST

20 Os produtos acabados sem afiamento PCR resultantes foram purificados usando-se o Kit de Purificação PCR (Qiagen, Alemanha), digeridos com as enzimas de restrição adequadas (Roche) e então inseridas no

P1041102

86

vetor de plasmídio binário pPI. O plasmídio pPI foi então  
construído mediante a inserção de uma sequência de sinal  
sintético poly-(A), originada do vetor de plasmídio básico  
pGL3 (Promega, Acc No U47295; bp 4658-4811) no local de  
5 restrição HindIII do vetor binário pBI101.3 (Clontech, Acc.  
No. U12640).

O plasmídio resultante pPI foi  
digerido com enzimas de restrição (BamHI e SacI; MBI  
Fermentas) e purificado usando-se o Kit de Purificação PCR  
10 (Qiagen, Alemanha). O construto pPI aberto foi então ligado  
com cada um dos sete produtos de PCR acima descritos. A  
ligação foi efetuada usando-se uma mistura de ligação  
contendo a enzima de ligase T4 DNA (Roche) e foi feita de  
acordo com as instruções do fabricante.

15 Os construtos de pPI abrigam os  
genes putativos de ABST foram introduzidos às células  
competentes E. coli DH5 por meio de eletroporação, usando um  
eletroporador MicroPulser (Biorad), cadinhos de 0,2 cm  
(Biorad) e programa de eletroporação EC-2 (Biorad). As  
20 células tratadas foram cultivadas em meio líquido LB a 37°C  
por 1 hora, então colocadas em placas sobre agar LB  
suplementadas com canamicina (50 mg/L; Sigma) e incubadas a  
37°C por 16 horas. As colônias que se desenvolveram no meio  
seletivo foram analisadas por PCR usando os primers  
25 estabelecidos nas SEQ ID Nos: 35-36, que foram designadas  
para abarcar a sequência inserida no plasmídio pPI. Os  
produtos de PCR resultantes foram separados em géis de  
agarose de 1,5% e o fragmento de DNA com o tamanho previsto

P1041102

89

foram isolados e seqüenciados usando o seqüenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc) a fim de verificar se as seqüências de DNA corretas foram devidamente introduzidas nas células E. coli.

#### 5 EXEMPLO 4

Geração de vetores binários que compreendam os genes putativos de ABST e os promotores de planta a eles ligados de forma operacional

Geração de vetores binários que  
10 compreendam o promotor 35S Vírus do Mosaico da Couve-Flor: A seqüência do promotor 35S do Vírus do Mosaico do Couve-Flor (estabelecida em SEQ ID NO: 19) foi inserida acima do gene putativo de ABST em cada um dos construtos pPI acima descritos. O promotor foi isolado do plasmídio pBI121  
15 (Clontech, Adesão No. AF485783) usando as endonucleases de restrição HindIII e BamHI (Roche). O promotor isolado foi ligado aos construtos de pPI digeridos com as mesmas enzimas. Em conjunto, os setes construtos pPI foram gerados, cada um compreendendo o promotor CaMV 35S posicionado acima  
20 de um gene putativo de ABST com uma seqüência estabelecida em SEQ ID NO: 1,4,8,9,12,13 ou 14.

Geração de vetores binários que compreenda o promotor At6669: A seqüência do promotor At6669 (estabelecida em SEQ ID NO: 20) foi inserida acima do gene  
25 putativo de ABST em cada um dos construtos binários pPI acima descritos. O promotor foi isolado do DNA genômico de Arabidopsis thaliana var Col0 por amplificação de PCR usando os primers estabelecidos em SEQ ID Nos: 37-38. O produto de

P1041182

90

PCR foi purificado (Qiagen, Alemanha) e digeridos com as endonucleases de restrição HindIII e BamHI (Roche). A sequência de promotor resultante foi introduzida nos construtos de binário aberto digeridos com as mesmas enzimas. Em conjunto, os sete construtos de pPI foram gerados, cada um compreendendo o promotor At6669 posicionado acima de um gene putativo de ABST com uma sequência estabelecida em SEQ ID NO: 1,4,8,9,12,13 ou 14.

#### EXEMPLO 5

10 Confirmação da atividade do promotor At6669 em *Arabidopsis thaliana* transgênica

A capacidade do promotor At-6669 de regular a transcrição de genes conduzidos pelo vetor pPI em plantas foi testada. Coerentemente, o promotor At6669 foi inserido acima no vetor binário pPI de um gene relator de luciferase. O vetor binário foi introduzido a plantas *Arabidopsis thaliana* usando-se o procedimento descrito no Exemplo 6 a seguir. As plantas T<sub>2</sub> *Arabidopsis* maduras transformadas foram ensaiadas para bio-iluminação em um quarto escuro usando uma câmera de detecção de luz ultrabaixa (Princeton Instruments Inc., USA) usando o procedimento descrito por Meissner et al. (Plant J. 22:265, 2000). Foi observada iluminação indicando atividade positiva de Luciferase nos tecidos meristemáticos de flor e raiz das plantas transformadas (Figura 2).

#### EXEMPLO 6

A transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* com vetores binários que abrigam

P1041182

41

genes putativos de ABST.

Cada um dos vetores binários descritos no Exemplo 4 acima foi usado para transformar as células de *Agrobacterium*. Dois construtos binários extras, com o gene relator de luciferase substituindo um gene ABST (posicionado acima do promotor 35S ou At6669), foram usados como controles negativos.

Os vetores binários foram introduzidos ao *Agrobacterium tumefaciens* GV301, ou células competentes LB4404 (cerca de  $10^9$  células/mL) por eletroporação. A eletroporação foi efetuada usando-se um eletroporador MicroPulser (Biorad), cadinhos de 0,2 cm (Biorad) e programa EC-2 de eletroporação (Biorad). As células tratadas foram cultivadas em meio líquido LB a 28°C por 3 horas, então colocadas em placas sobre agar LB suplementadas com gentamicina (50 mg/L; para cepas de *Agrobacterium* GV301) ou estreptomicina (300 mg/L; para cepa de *Agrobacterium* LB4404) e canamicina (50 mg/L) a 28°C por 48 horas. As colônias de *Agrobacterium* que se desenvolveram nos meios seletivos foram analisadas por PCR usando-se os primers estabelecidos nas SEQ ID Nos: 35-36, que foram designadas para abarcar a sequência inserida no plasmídio pPI. Os produtos de PCR resultantes foram isolados e sequenciados conforme descrito no Exemplo 4 acima, para verificar se as sequências de ABST corretas foram devidamente introduzidas às células *Agrobacterium*.

#### EXEMPLO 7

Transformation de plantas

P1041102

92

*Arabidopsis thaliana* com genes putativos de ABST

As plantas *Arabidopsis thaliana* Columbia (plantas T0) foram transformadas usando o procedimento Floral Dip descrito por Clough e Bent (10) e por Desfeux et al. (11), com modificações mínimas. De forma resumida, as plantas T<sub>0</sub> foram semeadas em vasos de 250 ml preenchidos com mistura de crescimento a base de turfa molhada. Os vasos foram cobertos com folha de alumínio e um domo de plástico, mantidos a 4°C por 3 a 4 dias, então descobertos e incubados em uma câmara de cultivo a 18-24°C sob ciclos claros/escuros de 16/8 horas. As plantas T0 estavam prontas para a transformação de seis dias antes da antese.

As colônias únicas de *Agrobacterium* portando os construtos binários, gerados conforme no Exemplo 6 acima, foram cultivadas em meio LB suplementados com canamicina (50 mg/L) e gentamicina (50 mg/L). As culturas foram incubadas a 28 °C por 48 horas sob agitação vigorosa e então centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. Os grânulos com as células *Agrobacterium* foram novamente suspensos em um meio de transformação contendo meia-força (2,15 g/L) Murashig-Skoog (Duchefa); 0,044 µM purina de benzilamina (Sigma); 112 µg/L vitaminas B5 Gambourg (Sigma); 5% sacarose; e 0,2 ml/L Silwet L-77 (OSI Specialists, CT) em água duplamente destilada, ao pH de 5.7.

A transformação de plantas T0 foi efetuada pela inversão de cada planta em uma suspensão de *Agrobacterium*, de modo que o tecido de planta acima do

## Pilotage

43  
solo foi submerso por 3 a 5 segundos. Cada planta T0 inoculada foi imediatamente colocada em uma bandeja de plástico, e então coberta com um domo de plástico transparente para manter a umidade e foi mantida no escuro a temperatura ambiente por 18 horas, para facilitar a infecção e transformação. As plantas transformadas (transgênicas) foram então descobertas e transferidas para uma estufa por recuperação e maturação. As plantas T0 transgênicas foram cultivadas na estufa por 3 a 5 semanas até que as sílicas ficaram marrons e secas. As sementes foram cultivadas a partir de plantas e mantida a temperatura ambiente até a semeadura.

Para gerar as plantas transgênicas T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> que abrigam os genes, as sementes coletadas de plantas T0 transgênicas foram esterilizadas na superfície mergulhando-se em etanol a 70% por 1 minuto, seguido de mergulho em hipoclorito de sódio a 5% e 0,05% Triton por 5 minutos. As sementes esterilizadas na superfície foram profundamente lavadas em água destilada estéril então colocadas em placas de cultura contendo meia-força Murashig-Skoog (Duchefa); 2% sacarose; 0,8% agar de planta; 50 mM canamicina; e 200 mM carbenicilina (Duchefa). As placas de cultura foram incubadas a 4°C por 48 horas, então transferidas a uma sala de crescimento a 25° C por uma semana adicional de incubação. As plantas vitais T<sub>1</sub> Arabidopsis foram transferidas para placas de cultura fresca por mais uma semana de incubação. Após a incubação as T<sub>1</sub> plantas foram removidas das placas de cultura e plantadas em

mistura de crescimento contida em vasos de 250 ml. As plantas transgênicas foram deixadas crescendo em uma estufa até a maturidade. As sementes cultivadas de plantas T1 foram cultivadas até a maturidade e as plantas T2 sob as mesmas condições usadas para as plantas T1.

#### EXEMPLO 8

Avaliação do crescimento das plantas transgênicas cultivadas sob condições de estresse abiótico

#### 10 Métodos:

Plantas T<sub>1</sub> ou T<sub>2</sub> transgênicas geradas conforme acima descrito foram transplantadas individualmente em vasos contendo uma mistura de crescimento de turfa e vermiculite (razão de volume 3:2, respectivamente). Os vasos foram cobertos por um período de 24 horas para endurecimento, então substituídas na estufa em ordem completamente randômica e irrigadas com água de torneira (fornecida a partir da parte de baixo dos vasos a cada 3 a 5 dias) por sete dias. Em seguida, metade das plantas foram irrigadas com uma solução de sal (100 mM NaCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub>) para induzir o estresse de salinidade (condições de estresse). A outra metade das plantas continuou a ser irrigada com água de torneira (condições normais). Todas as plantas foram cultivadas na estufa a 100% RH por 28 dias, então colhidas (o tecido acima do solo) e pesadas (imediatamente ou após a secagem em forno a 50 °C por 24 horas).

Resultados:

P1041102

95

Nenhuma diferença significativa nos pesos frescos de planta foi observada nas plantas T1 transformadas com 3 diferentes genes de ABST e plantas transformadas com o gene relator de luciferase, cultivadas sob condições normais ou de estresse (Figura 3 e Tabela 3 a seguir). Ainda assim, as plantas T1 transformadas com SEQ ID NO: 1, posicionadas sob o controle regulador do promotor At6669, mantiveram 71% de seu peso fresco quando expostas a condições de estresse, enquanto as plantas de controle (portando genes de Luciferase posicionado sob o controle regulador do promotor AT6669) mantiveram somente 61% do peso fresco sob condições de estresse similares.

Tabela 3

Peso fresco de plantas T1 transgênicas Arabidopsis irrigadas com água ou solução de sal

| Transgene (SEQ ID NO) | Promotor | Linhas N | Solução de irrigação (mM NaCl) | Média (g) | Erro Padrão |
|-----------------------|----------|----------|--------------------------------|-----------|-------------|
| Luciferase            | At6669   | 2        | 0                              | 0,7925    | 0,0275      |
| Luciferase            | At6669   | 2        | 100                            | 0,485     | 0,045       |
| 13                    | At6669   | 8        | 0                              | 0,81625   | 0,020305    |
| 13                    | At6669   | 8        | 100                            | 0,4725    | 0,029246    |
| 1                     | At6669   | 8        | 0                              | 0,7875    | 0,026032    |
| 1                     | At6669   | 8        | 100                            | 0,55875   | 0,044699    |
| 8                     | At6669   | 8        | 0                              | 0,8575    | 0,023088    |
| 8                     | At6669   | 8        | 100                            | 0,440625  | 0,011198    |

<sup>1</sup> As linhas N representam o número do evento de transformação independente de plantas medido. Para cada transgene, os eventos de transformação independente 3-5 com 1-3 plantas para um único evento de transformação foram usados.

Plantas T2 transformadas com

P1041102

96

SEQ ID Nos: 7 ou 14 posicionadas sob o controle regulador do promotor 35S acumularam biomassa significativamente maior do que as plantas de controle, independentemente das condições de crescimento. Conforme mostrado na Figura 4A e na Tabela 4 a seguir, o peso fresco médio das plantas transformadas com SEQ ID Nos: 7 e 14, cultivadas sob condições de estresse eram 15% e 24%, respectivamente, maiores do que o peso fresco médio das plantas de controles cultivadas sob condições de estresse similares. Similarmente, o peso fresco médio de plantas transformadas com SEQ ID Nos: 7 ou 14, cultivadas sob condições normais, eram de 21% e 27%, respectivamente, maiores do que o peso fresco médio das plantas de controles cultivadas sob condições normais similares.

Foi observado fenômeno similar com plantas T2 transformadas com SEQ ID NO: 4 posicionadas sob o controle regulador do promotor 35S. Coerentemente, conforme mostrado na Figura 4A e Tabela 4 a seguir, o peso fresco médio das plantas transformadas com SEQ ID NO: 4 era de 14% e 7% maior do que o peso fresco médio de plantas de controle cultivadas sob condições de estresse e normais, respectivamente. De forma similar, as plantas T2 transformadas com SEQ ID NO: 4 posicionadas sob o controle regulador do promotor At6669 exibiram biomassa 1,3 e 5% maior do que as plantas de controle cultivadas sob condições de estresse e normais, respectivamente. Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente diferentes sob condições experimentais.

Tabela 4

97

Peso fresco de plantas T<sub>2</sub> transgênicas Arabidopsis irrigadas com água ou solução de sal

| Transgene (SEQ ID NO) | Promotor | Linhas N | Solução de irrigação (mM NaCl) | Médio (g) | Erro Padrão |
|-----------------------|----------|----------|--------------------------------|-----------|-------------|
| Luciferase            | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,352727  | 0,011208    |
| Luciferase            | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,280909  | 0,010484    |
| 9                     | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,426364  | 0,019599    |
| 9                     | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,322727  | 0,027306    |
| 12                    | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,374545  | 0,015746    |
| 12                    | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,249091  | 0,020647    |
| 1                     | CaMV-35S | 8        | 0                              | 0,36625   | 0,034171    |
| 1                     | CaMV-35S | 8        | 100                            | 0,265     | 0,031225    |
| 13                    | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,349091  | 0,013515    |
| 13                    | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,293636  | 0,019921    |
| 14                    | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,446364  | 0,025558    |
| 14                    | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,348182  | 0,023772    |
| 8                     | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,310909  | 0,015223    |
| 8                     | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,253636  | 0,01539     |
| 4                     | CaMV-35S | 11       | 0                              | 0,379091  | 0,010992    |
| 4                     | CaMV-35S | 11       | 100                            | 0,318182  | 0,013336    |

5 <sup>1</sup> As linhas N representam o número do evento de transformação independente de plantas medido. Para cada transgene, os eventos de transformação independente 3-5 com 1-3 plantas para um único evento de transformação foram usados.

10 Plantas T<sub>2</sub> transformadas com SEQ ID Nos: 1 e 13 posicionadas sob o controle regulador do promotor At6669 e cultivadas sob condições de estresse, exibiram biomassa significativamente maior do que as plantas de controle cultivadas sob condições de estresse similares.

15 O peso fresco médio das plantas T<sub>2</sub> transformadas com SEQ ID Nos: 1 e 13, posicionadas sob o controle regulador do promotor At6669 e cultivadas sob condições de estresse eram

37% e 21%, respectivamente, maiores do que o peso fresco médio das plantas de controles cultivadas sob condições de estresse similares (Figura 4B e Tabela 5 a seguir). Não foi observado aumento significativo da biomassa quando essas plantas transgênicas (portando as SEQ ID Nos: 1 e 13 reguladas sob o promotor At6669) foram cultivadas sob condições normais.

Tabela 5

Peso fresco de plantas T<sub>2</sub> transgênicas Arabidopsis irrigadas com água ou solução de sal

| Transgene (SEQ ID NO) | Promotor | Linhas N | Solução de irrigação (mM NaCl) | Média (g) | Erro Padrão |
|-----------------------|----------|----------|--------------------------------|-----------|-------------|
| Luciferase            | At6669   | 6        | 0                              | 0,3       | 0,010328    |
| Luciferase            | At6669   | 6        | 100                            | 0,125     | 0,009916    |
| 13                    | At6669   | 6        | 0                              | 0,286667  | 0,024449    |
| 13                    | At6669   | 6        | 100                            | 0,151667  | 0,007032    |
| 1                     | At6669   | 6        | 0                              | 0,305     | 0,03423     |
| 1                     | At6669   | 6        | 100                            | 0,171667  | 0,012225    |
| 4                     | At6669   | 6        | 0                              | 0,315     | 0,049983    |
| 4                     | At6669   | 6        | 100                            | 0,126667  | 0,005578    |
| 12                    | At6669   | 6        | 0                              | 0,263333  | 0,012824    |
| 12                    | At6669   | 6        | 100                            | 0,098333  | 0,007923    |
| 8                     | At6669   | 6        | 0                              | 0,228333  | 0,020235    |
| 8                     | At6669   | 6        | 100                            | 0,121667  | 0,004014    |

<sup>1</sup> As linhas N representam o número do evento de transformação independente de plantas medido. Para cada transgene, os eventos de transformação independente 3-5 com 1-3 plantas para um único evento de transformação foram usados.

Os resultados ilustram que os genes putativos de ABST isolados, estabelecidos nas SEQ ID Nos: 1 e 13, são capazes de aumentar a tolerância da planta ao estresse abiótico, como um estresse por salinidade. Além

P 1041102

99

disso, os genes putativos de ABST isolados estabelecidos nas SEQ ID Nos: 7, 14 (e possivelmente também 4), são capazes de promover substancialmente o crescimento de biomassa em plantas cultivadas sob, assim como sob condições normais.

5 Assim sendo, os resultados indicam claramente que os genes putativos de tolerância a estresse abiótico aqui descritos podem ser facilmente isolados e usados para aumentar substancialmente a tolerância a estresse abiótico e/ou a biomassa nas plantas.

10 Aprecia-se que determinadas características da invenção, que são, para esclarecer, descritas no contexto de configurações separadas, também podem ser fornecidas em combinação com uma única configuração. De forma inversa, várias características da  
15 invenção, que são descritas no contexto de uma única configuração, para ser mais resumida, também pode ser fornecida separadamente ou em qualquer combinação adequada.

Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com as configurações específicas da  
20 mesma, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão óbvias àqueles com conhecimento na técnica. Coerentemente, pretende-se abraçar todas as alternativas, modificações e variações que estejam dentro do espírito e do amplo escopo das reivindicações em anexo. Todas as  
25 publicações, patentes, pedidos de patente e seqüências identificadas pelos números de adesão, mencionados nesta especificação, são aqui incorporados por meio de referência na especificação, na mesma extensão como se cada uma das

P 1041182

publicações, patentes, pedidos de patente e seqüências, identificadas pelos números de adesão fosse específica e individualmente indicados como se incorporados aqui por meio de referência. Além disso, a citação ou identificação de qualquer referência nesse pedido não deve ser interpretada como a admissão de que tal referência esteja disponível como técnica anterior à presente invenção.

Legenda da Figura 1

- 1.1 Seqüências do banco de genes
- 10 1.2 Agrupamento e Montagem de seqüências de banco de genes do NCBI
- 1.3 A partir da Literatura
- 1.4 Banco de dados de clusters (cada cluster com seus componentes de seqüências)
- 15 1.5 Banco de dados de biblioteca
- 1.6 Banco de dados de genes conhecidos
- 1.7 Banco de dados de palavras-chave
- 1.8 Bibliotecas filtradas por palavras-chave
- 1.9 Banco de dados de bibliotecas filtradas
- 20 1.10 Filtrar clusters de acordo com sua afiliação de biblioteca de seqüências
- 1.11 Programa BLAST
- 1.12 Banco de dados de genes de conhecimento anterior
- 1.13 Banco de dados de clusters filtrados
- 25 1.14 Filtragem de genes constitutivos
- 1.15 Banco de dados de clusters duplamente filtrados
- 1.16 Verificando o *mach*
- 1.17 *Mach* ruim

P1041102

101

1.18 Mach bom

1.19 Os genes desejados!

#### Referências Citadas

(As referências adicionais foram citadas anteriormente)

- 5 1. [www.fao.org/ag/agl/agll/spush/degrad.htm](http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/degrad.htm).
2. [www.fao.org/ag/agl/aglw/watermanagement/introduc.stm](http://www.fao.org/ag/agl/aglw/watermanagement/introduc.stm)
3. McCue KF, Hanson AD (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotechnol 8: 358-362.
- 10 4. Flowers TJ, Yeo Ar (1995). Breeding for salinity resistance in plantations: where next? Aust J Planta Physiol 22:875-884.
5. Nguyen BD, Brar DS, Bui BC, Nguyen TV, Pham LN, Nguyen HT (2003). Identification and mapping of the QTL for
- 15 aluminum tolerance introgressed from the new source, ORYZA RUFIPOGON Griff., into indicates rice ( Oryza sativa L.).Theor Appl Genet. 106:583-93.
6. Sanchez AC, Subudhi PK, Rosenow DT, Nguyen HT (2002). Mapping QTLs associated com drought resistance in
- 20 sorghum (Sorghum bicolor L. Moench).Planta Mol Biol. 48:713-26.
7. Quesada V, Garcia-Martinez S, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL (2002). Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis.Plant Physiol. 130:951-963.
- 25 8. Apse MP, Blumwald E (2002). Engineering salt tolerance in plants. Curr Opin Biotechnol. 13:146-150.
9. Rontein D, Basset G, Hanson AD (2002). Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in

P1041182

plants.Metab Eng 4:49-56

102

10. Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16:735-43.

5 11. Desfeux C, Clough SJ, Bent AF (2000). Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. Plant Physiol 123:895-904.

REIVINDICAÇÕES

1. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO", caracterizado por compreender expressar dentro da planta um polipeptídeo exógeno codificado por um polinucleotídeo estabelecido pela ID SEQ. N° 1, aumentando, assim, a tolerância da planta ao estresse salino.

2. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida expressão ser efetuada por meio de: a) transformação de uma célula da referida planta com o referido polinucleotídeo exógeno; b) geração de uma planta madura a partir da referida célula; e c) cultivo da referida planta madura sob condições adequadas para expressão do referido polinucleotídeo exógeno dentro da referida planta madura.

3. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a referida transformação ser efetuada por meio de introdução na referida célula de planta de um construto de ácido nucleico, incluindo o referido polinucleotídeo exógeno e, um promotor capaz de direcionar a transcrição do referido polinucleotídeo exógeno na referida célula de planta.

4. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por um promotor ser um promotor constitutivo.

5. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido promotor constitutivo ser um promotor CaMV 35S.

5 6. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido promotor constitutivo ser um promotor At6669.

10 7. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por um promotor ser um promotor induzível.

15 8. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o referido promotor induzível ser um promotor induzível por estresse abiótico.

20 9. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida expressão ser efetuada pela infecção da referida planta com um vírus, incluindo o referido polinucleotídeo exógeno.

25 10. MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o referido vírus ser um vírus avirulento.

11. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida planta ser uma

planta dicotiledônea.

12. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO" de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida planta ser uma  
5 planta monocotiledônea.

13. "CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO", caracterizado por compreender o polinucleotídeo estabelecido pela ID SEQ. Nº 1, e um promotor capaz de direcionar a transcrição do polinucleotídeo em uma célula  
10 hospedeira, o referido promotor sendo o promotor At6669.

14. "CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO", de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida célula hospedeira ser uma célula de planta.

15. "CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO", de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a referida célula de planta ser parte de uma célula de planta dicotiledônea.

16. "CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO", de acordo com a reivindicação 14, caracterizado  
20 por a referida célula de planta ser parte de uma célula de planta monocotiledônea.

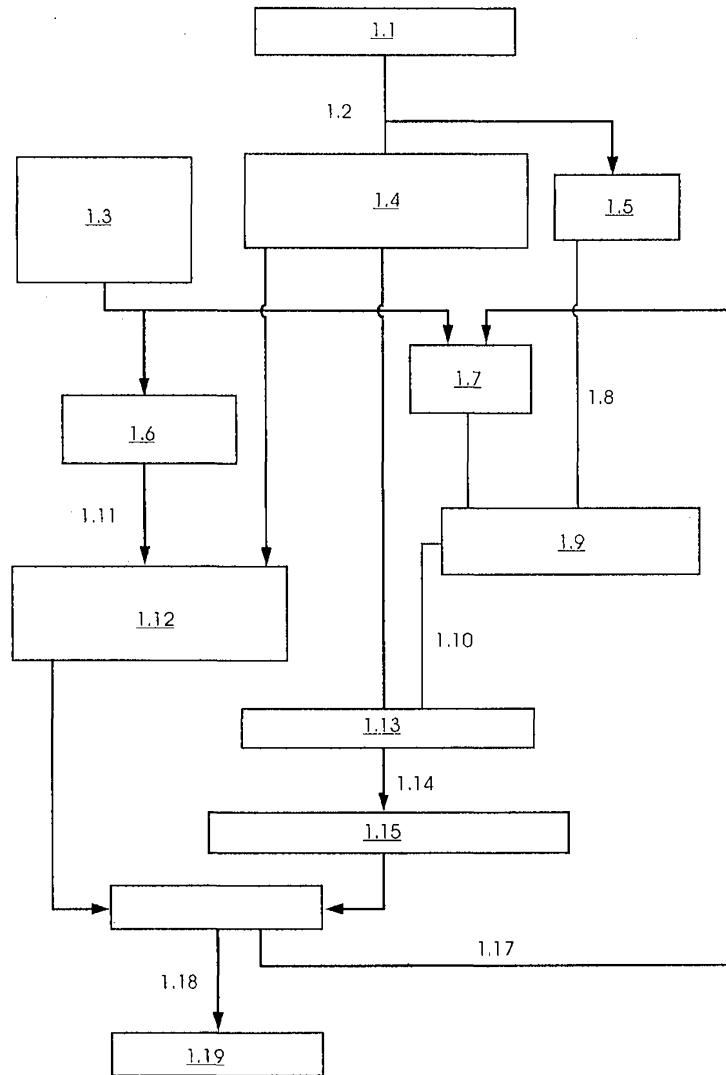


FIG. 1

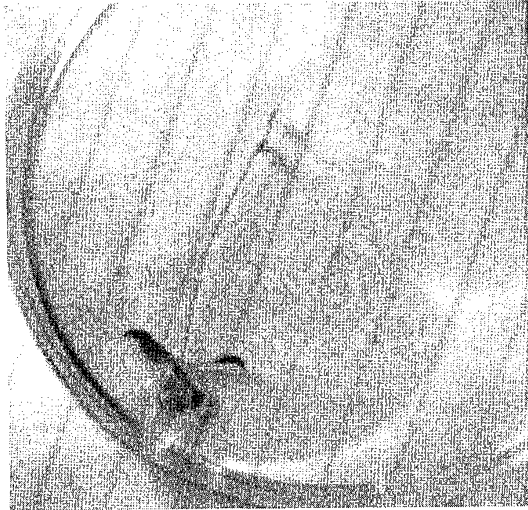


FIG. 2A

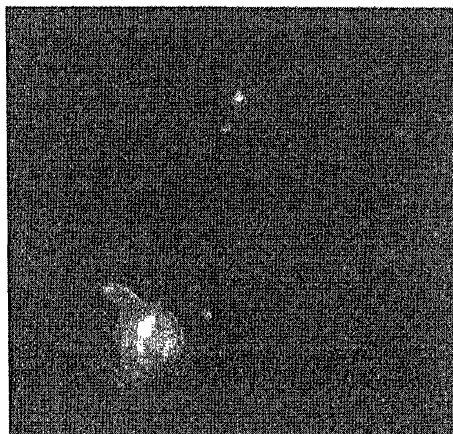


FIG. 2B

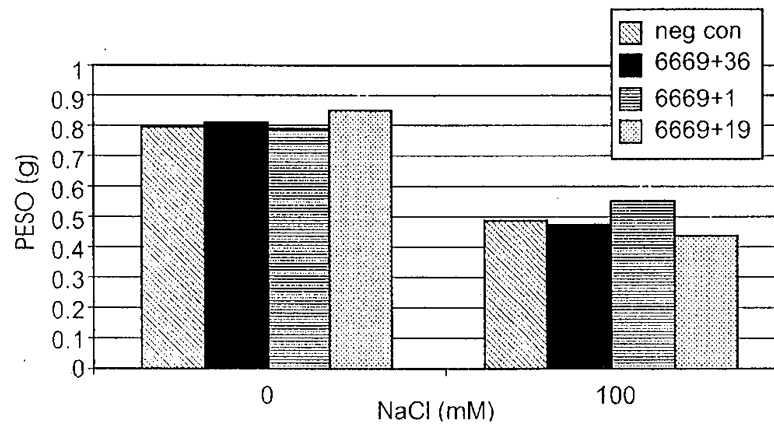


FIG.3

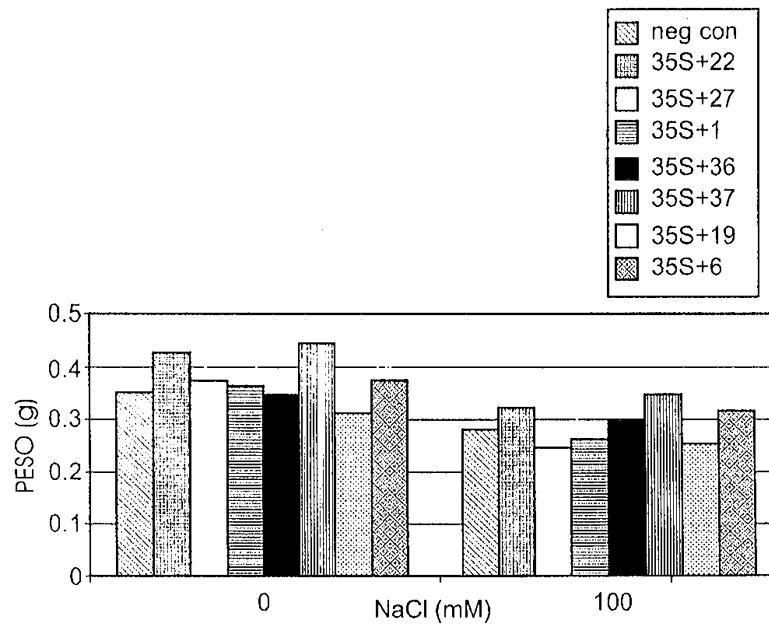


FIG.4A

200

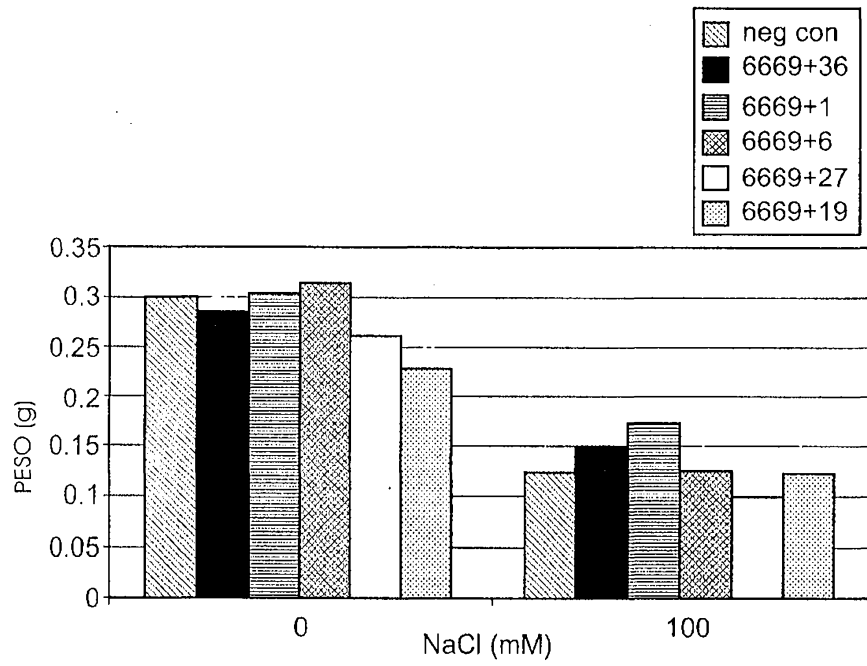


FIG.4B

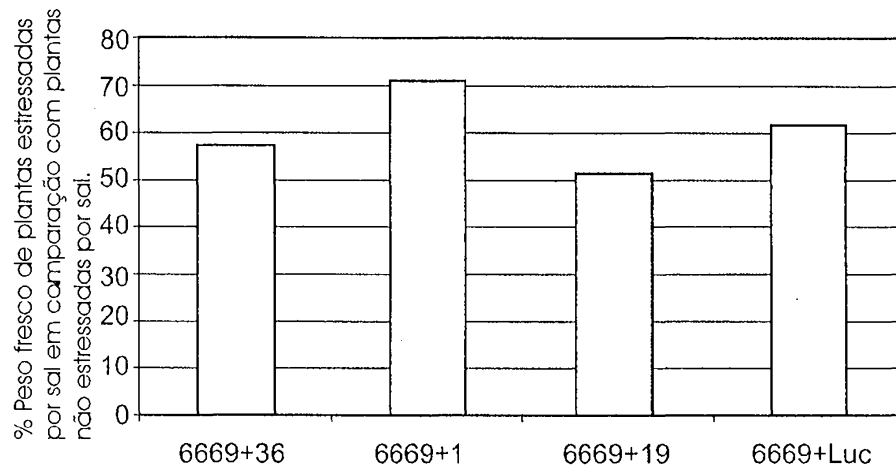


FIG.5

RESUMO

"MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO ESTRESSE SALINO E CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO", compreende as sequências de polinucleotídeo e métodos de utilização das mesmas para aumentar a tolerância de uma planta a estresses abióticos e/ou aumento da biomassa de uma planta.