



República Federativa do Brasil  
Ministério de Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

**(21) PI 0809163-3 A2**



\* B R P I 0 8 0 9 1 6 3 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 20/03/2008

**(43) Data da Publicação: 16/09/2014**  
**(RPI 2280)**

**(51) Int.Cl.:**

**C12N 15/82**  
**A01H 5/00**

**(54) Título:** CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA OU UMA PLANTA TRANSGÊNICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, E, MÉTODOS DE PRODUZIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA, E DE AUMENTAR UM CRESCIMENTO E/OU RENDIMENTO DA PLANTA SOB CONDIÇÕES NORMAIS OU LIMITADAS EM ÁGUA E/OU AUMENTAR UMA TOLERÂNCIA DA PLANTA A UM ESTRESSE AMBIENTAL

**(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 23/03/2007 US 60/896505

**(73) Titular(es):** Basf Plant Science GMBH

**(72) Inventor(es):** Amber Shirley, Bryan Mckersie , Damian Allen

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & Cia.

**(86) Pedido Internacional:** PCT EP2008053382 de 20/03/2008

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/116829de 02/10/2008

“CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA OU UMA PLANTA  
TRANSGÊNICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO  
ISOLADO, E, MÉTODOS DE PRODUZIR UMA PLANTA  
TRANSGÊNICA, E DE AUMENTAR UM CRESCIMENTO E/OU  
5 RENDIMENTO DA PLANTA SOB CONDIÇÕES NORMAIS OU  
LIMITADAS EM ÁGUA E/OU AUMENTAR UMA TOLERÂNCIA DA  
PLANTA A UM ESTRESSE AMBIENTAL”

#### CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção diz respeito no geral às plantas transgênicas que  
10 superexpressam sequências de ácido nucleico que codificam polipeptídeos  
capazes de conferir tolerância ao estresse aumentada e consequentemente,  
crescimento de planta e rendimento de safra aumentados, sob condições de  
estresse normal ou abiótico. Adicionalmente, a invenção diz respeito a novas  
sequências de ácido nucleico isoladas que codificam polipeptídeos que  
15 conferem em uma planta tolerância aumentada sob condições de estresse  
abiótico e/ou crescimento de planta aumentado e/ou rendimento aumentado  
sob condições de estresse normal ou abiótico.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Estresses ambientais abióticos, tais como seca, salinidade,  
20 calor e frio, são fatores limitantes principais de crescimento de planta e  
rendimento de safra. Rendimento de safra é aqui definido como o número de  
*bushels* de produto agrícola relevante (tal como grão, forragem ou semente)  
colhidos por acre. As perdas de safra e as perdas de rendimento de safra de  
safras principais tais como soja, arroz, milho (milho), algodão e trigo causada  
25 por estes estresses representam um fator econômico e político significativo e  
contribuem para a escassez de alimento em muitos países subdesenvolvidos.

A disponibilidade de água é um aspecto importante do estresse  
abiótico e seus efeitos sobre o crescimento de planta. A exposição contínua às  
condições de seca causa alterações maiores no metabolismo da planta que por

fim leva à morte da célula e conseqüentemente às perdas de rendimento. Porque o teor de sal alto em alguns sólidos resulta em menos água estando disponível para a captação pela célula, a concentração de sal alto tem um efeito sobre as plantas similar ao efeito da seca sobre as plantas.

5 Adicionalmente, sob temperaturas congelantes, as células vegetais perdem água como um resultado da formação de gelo dentro da planta. Conseqüentemente, o dano de safra do estresse pela seca, calor, salinidade e frio, é predominantemente devido à desidratação.

10 Porque as plantas são tipicamente expostas às condições de disponibilidade de água reduzida durante o seu ciclo de vida, a maioria das plantas desenvolveram mecanismos protetores contra a dessecação causada pelos estresses abióticos. Entretanto, se a severidade e duração das condições de dessecação são muito grandes, os efeitos sobre o desenvolvimento, crescimento, tamanho da planta e rendimento da maioria das plantas de safra  
15 são profundos. Desenvolver plantas eficientes no uso de água é portanto uma estratégia que tem o potencial para melhorar significativamente a vida humana em uma escala mundial.

20 As estratégias de cruzamento de planta tradicionais são relativamente lentas e requerem linhagens iniciadoras tolerantes ao estresse abiótico para cruzar com outros germoplasma para desenvolver novas linhagens resistentes ao estresse abiótico. Recursos de germoplasma limitados para tais linhagens iniciadoras e a incompatibilidade nos cruzamentos entre espécies de planta distantemente relacionadas representam problemas  
25 significantes encontrados na geração convencional. A geração quanto a tolerância tem sido amplamente mal sucedida.

Muitas companhias de biotecnologia agrícola têm tentado identificar genes que pudessem conferir tolerância às respostas ao estresse abiótico, em um esforço para desenvolver plantas de safra transgênicas tolerantes ao estresse abiótico. Embora alguns genes que estão envolvidos nas

respostas ao estresse ou eficiência do uso da água em plantas tenham sido caracterizados, a caracterização e clonagem de genes vegetais que conferem tolerância ao estresse e/ou eficiência no uso da água permanece amplamente incompletas e fragmentadas. Até agora, o sucesso no desenvolvimento de plantas de safra transgênicas tolerantes ao estresse abiótico tem sido limitado e nenhuma de tais plantas foram comercializadas.

De modo a desenvolver plantas de safra transgênicas tolerantes ao estresse abiótico, é necessário ensaiar vários parâmetros em sistemas de planta modelo, estudos em estufa de plantas de safra e em testes de campo. Por exemplo, a eficiência no uso da água (WUE), é um parâmetro frequentemente correlacionado com a tolerância à seca. Estudos de uma resposta da planta à dessecação, choque osmótico e extremos de temperatura também são utilizados para determinar a tolerância ou resistência aos estresses abióticos da planta. Quando do teste quanto ao impacto da presença de um transgene em uma tolerância ao estresse da planta, a capacidade para padronizar as propriedades do solo, temperatura, água e disponibilidade de nutriente e intensidade de luz é uma vantagem intrínseca de ambientes de estufa ou câmara de crescimento de planta comparadas com o campo.

A WUE foi definida e medida em modos múltiplos. Um método é calcular a razão de peso seco da planta inteira, para o peso de água consumido pela planta por toda a sua vida. Uma outra variação é usar um intervalo de tempo mais curto quando o acúmulo de biomassa e o uso da água são medidos. Já um outro método é usar medições de partes restritas da planta, por exemplo, medir apenas o crescimento aéreo e o uso da água. A WUE também foi definida como a razão de captação de CO<sub>2</sub> para a perda de vapor d'água de uma folha ou porção de uma folha, frequentemente medido em um período de tempo muito curto (por exemplo, segundos/minutos). A razão de <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C fixada no tecido vegetal e medido com um espectrômetro de massa de razão isotópica, também tem sido usado estimar a WUE em plantas

usando a fotossíntese de  $C_3$ .

Um aumento na WUE é informativo a cerca da eficiência relativamente melhorada de crescimento e consumo de água, mas esta informação tomada sozinha não indica se um destes dois processos tenha mudado ou ambos tenham mudado. Na seleção de traços para melhorar safras, um aumento na WUE devido a uma diminuição no uso da água, sem uma mudança no crescimento teria mérito particular em um sistema agrícola irrigado onde os custos de entrada de água foram altos. Um aumento na WUE direcionada principalmente por um aumento no crescimento sem uma mudança súbita correspondente no uso da água teria aplicabilidade a todos os sistemas agrícolas. Em muitos sistemas agrícolas onde o fornecimento de água não é limitante, um aumento no crescimento, mesmo se ele vem às custas de um aumento no uso da água (isto é, nenhuma mudança na WUE), também aumentaria o rendimento. Portanto, novos métodos para aumentar tanto a WUE quanto o acúmulo de biomassa são requeridos para melhorar a produtividade agrícola.

Concomitante com as medições de parâmetros que se correlacionam com a tolerância ao estresse abiótico são medições de parâmetros que indicam o impacto potencial de um transgene sobre o rendimento de safra. Para as safras de forragem como alfafa, milho de silagem e feno, a biomassa vegetal correlaciona-se com o rendimento total. Para as safras de grão, entretanto, outros parâmetros foram usados para estimar o rendimento, tal como tamanho da planta, como medido pelo peso seco da planta total, o peso seco acima do solo, o peso fresco acima do solo, área de folha, volume do caule, altura da planta, diâmetro da roseta, comprimento da folha, comprimento da raiz, massa da raiz, número de brotos e número de folhas. O tamanho da planta em um estágio de desenvolvimento inicial tipicamente correlacionar-se-á com o tamanho da planta mais tarde no desenvolvimento. Um planta maior com uma área de folha maior pode

tipicamente absorver mais luz e dióxido de carbono do que uma planta menor e portanto provavelmente ganhará um peso maior durante o mesmo período. Isto é, além da continuação potencial da vantagem micro-ambiental ou genética que a planta teve para alcançar o tamanho inicialmente maior. Existe  
5 um componente genético forte para o tamanho da planta e taxa de crescimento e assim para uma faixa de genótipos diversos de tamanho da planta sob uma condição ambiental é provável correlacionar-se com o tamanho sob uma outra. Deste modo um ambiente padrão é usado para se aproximar dos ambientes diversos e dinâmicos encontrados em locais e tempos diferentes  
10 pelas safras no campo.

O índice de colheita, a razão do rendimento de semente para o peso seco acima do solo, é relativamente estável sob muitas condições ambientais e assim uma correlação robusta entre o tamanho da planta e rendimento de grão é possível. O tamanho da planta e o rendimento do grão  
15 estão intrinsecamente ligados, porque a maioria da biomassa de grão é dependente da produtividade fotossintética corrente ou armazenada pelas folhas e caules da planta. Portanto, selecionar quanto ao tamanho da planta, mesmo nos estágios iniciais de desenvolvimento, tem sido usado como para triar quanto a plantas que possam demonstrar rendimento aumentado quando  
20 expostas ao teste de campo. Como com a tolerância ao estresse abiótico, as medições de tamanho da planta no desenvolvimento inicial, sob condições padronizadas em uma câmara de crescimento ou estufa, são práticas padrão para medir as vantagens de rendimento potencial conferidas pela presença de um transgene.

25 Existe uma necessidade, portanto, para identificar genes adicionais expressados nas plantas tolerantes ao estresse e/ou plantas que são eficientes no uso da água que têm a capacidade para conferir tolerância ao estresse e/ou eficiência aumentada no uso da água para a planta hospedeira e para outras espécies vegetais. Plantas tolerantes ao estresse e/ou plantas com

eficiência aumentada no uso da água recém geradas terão muitas vantagens, tais como uma faixa aumentada em que as plantas de safra possam ser cultivadas, por exemplo, pela diminuição das exigências de água de uma espécie vegetal. Outras vantagens desejadas incluem resistência aumentada para fixação, a flexão de brotos ou caules em resposta ao vento, chuva, pragas ou doença.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores descobriram que transformar uma planta com certos polinucleotídeos resulta no realce do crescimento e/ou resposta da planta ao estresse ambiental e conseqüentemente o rendimento dos produtos agrícolas da planta é aumentado, quando os polinucleotídeos estão presentes na planta como transgenes. Os polinucleotídeos capazes de mediar tais realces foram isolados de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Zea mays*, *Linum usitatissimum*, *Oryza satvia*, *Glycine max* ou *Triticum aestivum* e são listados na Tabela 1 e as suas seqüências são apresentadas na Listagem de Sequência como indicado na Tabela 1.

Tabela 1

Nome do Gene	ID do Gene	Organismo	SEQ ID NO do Polinucleotídeo	SEQ ID NO do Aminoácido
PpTPT-1	EST 214	<i>P. patens</i>	1	2
PpCDC2-1	EST 280	<i>P. patens</i>	3	4
PpLRP-1	EST 298a	<i>P. patens</i>	5	6
	EST 298b	<i>P. patens</i>	55	56
	EST 298c	<i>P. patens</i>	57	58
PpRBP-1	EST 300	<i>P. patens</i>	7	8
PpPD-1	EST 362	<i>P. patens</i>	9	10
PpMSC-1	EST 378	<i>P. patens</i>	11	12
PpMBP-1	EST 398	<i>P. patens</i>	13	14
PpAK-1	EST 407	<i>P. patens</i>	15	16
PpZF-6	EST 458	<i>P. patens</i>	17	18
PpCDK-1	EST 479	<i>P. patens</i>	19	20
PpZF-7	EST 520	<i>P. patens</i>	21	22
PpMFP-1	EST 544	<i>P. patens</i>	23	24
PpLRP-2	EST 545	<i>P. patens</i>	25	26
PpPPK-1	EST 549	<i>P. patens</i>	27	28
PpSRP-1	EST 554	<i>P. patens</i>	29	30
PpCBL-1	EST 321	<i>P. patens</i>	31	32
PpCBL-2	EST 416	<i>P. patens</i>	33	34
PpHD-1	EST 468	<i>P. patens</i>	35	36
BnHD-1	BN51361834	<i>B. napus</i>	37	38

Nome do Gene	ID do Gene	Organismo	SEQ ID NO do Polinucleotídeo	SEQ ID NO do Aminoácido
BnHD-2	BN50000854	<i>B. napus</i>	39	40
ZmHD-1	ZM59324542	<i>Z. mays</i>	41	42
LuHD-1	LU61552369	<i>L. usitatissimum</i>	43	44
OsHD-1	OS34631911	<i>O. sativa</i>	45	46
GmHD-1	GM59700314	<i>G. max</i>	47	48
GmHD-2	GM49753757	<i>G. max</i>	49	50
GmHD-3	GM50270592	<i>G. max</i>	51	52
TaHD-1	TA60089198	<i>T. aestivum</i>	53	54

Em uma forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma tRNA 2'-fosfotransferase.

5 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma quinase de proteína de controle da divisão celular.

10 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de repetição rica em leucina.

15 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína que liga Ran.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de divisão de plastídeo.

20 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína carreadora do substrato mitocondrial.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma

planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de MAD5-box.

5 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína da adenosina quinase-1.

10 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de dedo de zinco 6.

15 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de subunidade reguladora da quinase dependente de ciclina.

20 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de dedo de zinco 7.

25 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de ligação de MAR.

30 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína receptora da repetição rica em leucina.

35 Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que

compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da quinase de proteína fitocrômica.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que  
5 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sinaptobrevina.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que  
compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína B de calcineurina.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma  
10 planta transgênica transformada com um cassete de expressão que  
compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da caleosina.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma  
planta transgênica transformada com um cassete de expressão que  
compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da histona  
15 desacetilase.

Em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito a  
uma semente produzida pela planta transgênica da invenção, em que a  
semente é geração verdadeira para um transgene que compreende o  
polinucleotídeo descrito acima. As plantas derivadas da semente da invenção  
20 demonstram tolerância aumentada a um estresse ambiental e/ou crescimento  
de planta aumentado e/ou rendimento aumentado, sob condições normal ou de  
estresse quando comparadas com uma variedade do tipo selvagem da planta.

Ainda em um outro aspecto, a invenção diz respeito a produtos  
produzidos pelas ou das plantas transgênicas da invenção, suas partes vegetais  
25 ou suas sementes, tais como um gênero alimentício, ração, suplemento  
alimentar, suplemento de ração, cosmético ou produto farmacêutico.

A invenção fornece ainda os polinucleotídeos isolados  
identificados na Tabela 1 ou na Tabela 2 abaixo e polipeptídeos identificados  
na Tabela 1. A invenção também é personificada em vetor recombinante que

compreende um polinucleotídeo isolado da invenção.

Ainda em uma forma de realização, a invenção diz respeito a um método de produzir a planta transgênica supracitada, em que o método compreende transformar uma célula vegetal com um vetor de expressão que  
5 compreende um polinucleotídeo isolado da invenção e gerar a partir da célula vegetal uma planta transgênica que expressa o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo. A expressão do polipeptídeo na planta resulta na tolerância aumentada a um estresse ambiental e/ou crescimento e/ou rendimento sob condições normais e/ou de estresse quando comparadas com uma variedade  
10 do tipo selvagem da planta.

Ainda em uma outra forma de realização, a invenção fornece um método de aumentar uma tolerância da planta a um estresse ambiental e/ou crescimento e/ou rendimento. O método compreende as etapas de transformar uma célula vegetal com um cassete de expressão que compreende  
15 um polinucleotídeo isolado da invenção e gerar uma planta transgênica a partir da célula vegetal, em que a planta transgênica compreende o polinucleotídeo.

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Figura 1 é um diagrama que ilustra as relações filogenéticas  
20 entre as sequências de aminoácido de PpHD-1 (SEQ ID NO:36), BnHD-1 (SEQ ID NO:38), BnHD-2 (SEQ ID NO:40), ZmHD-1 (SEQ ID NO:42), LuHD-1 (SEQ ID NO:44), OsHD-1 (SEQ ID NO:46), GmHD-1 (SEQ ID NO:48), GmHD-2 (SEQ ID NO:50), GmHD-3 (SEQ ID NO:52) e TaHD-1 (SEQ ID NO:54) divulgadas. O diagrama foi gerado usando Align X da  
25 Vector NTI.

A Figura 2 mostra um alinhamento das sequências de aminoácido divulgadas: PpHD-1 (SEQ ID NO:36), BnHD-1 (SEQ ID NO:38), BnHD-2 (SEQ ID NO:40), ZmHD-1 (SEQ ID NO:42), LuHD-1 (SEQ ID NO:44), OsHD-1 (SEQ ID NO:46), GmHD-1 (SEQ ID NO:48),

GmHD-2 (SEQ ID NO:50), GmHD-3 (SEQ ID NO:52) e TaHD-1 (SEQ ID NO:54). O alinhamento foi gerado usando Align X da Vector NTI.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

5 Por todo este pedido, várias publicações são dadas como referência. As divulgações de todas estas publicações e daquelas referências citadas dentro destas publicações em suas totalidades são por meio deste incorporadas por referência neste pedido de modo a descrever mais completamente o estado da técnica à qual esta invenção pertence. A  
10 terminologia aqui usada é com o propósito de descrever apenas as formas de realização específicas e não é intencionada a ser limitante. Como aqui usado, “um” ou “uma” podem significar um(a) ou mais, dependendo do contexto em que são usados. Assim, por exemplo, referência a “uma célula” pode significar que pelo menos uma célula pode ser usada.

15 Em uma forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica que super expressa um polinucleotídeo isolado identificado na Tabela 1 ou um homólogo deste. A planta transgênica da invenção demonstra uma tolerância aumentada a um estresse ambiental quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da planta. A super expressão de tais ácidos  
20 nucleicos isolados na planta pode opcionalmente resultar em um aumento no crescimento de planta ou no rendimento de produtos agrícolas associados, sob condições normais ou de estresse, quando comparados com uma variedade do tipo selvagem da planta. Sem desejar estar ligado por qualquer teoria, acredita-se que a tolerância aumentada a um estresse ambiental, crescimento  
25 aumentado e/ou rendimento aumentado de uma planta transgênica da invenção resulte de um aumento na eficiência no uso da água da planta.

Como aqui definido, uma “planta transgênica” é uma planta que foi alterada usando a tecnologia de DNA recombinante para conter um ácido nucleico isolado que de outro modo não estaria presente na planta.

Como aqui usado, o termo “planta” inclui uma planta inteira, células vegetais e partes de planta. As partes de planta incluem, mas não são limitadas a, caules, raízes, óvulos, estames, folhas, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, gametófitos, esporófitos, pólen, microesporos e outros. A  
5 planta transgênica da invenção pode ser estéril macho ou fértil macho e pode incluir ainda transgenes outros que não aqueles que compreendem os polinucleotídeos isolados aqui descritos.

Como aqui usado, o termo “variedade” refere-se a um grupo de plantas dentro de uma espécie que compartilha características constantes  
10 que as separam da forma típica e de outras variedades possíveis dentro desta espécie. Embora possuam pelo menos um traço distintivo, uma variedade também é caracterizada por alguma variação entre indivíduos dentro da variedade, com base primariamente na segregação Mendeliana de traços entre a progênie de gerações sucessoras. Uma variedade é considerada “geração  
15 verdadeira” quanto a um traço particular se a mesma é geneticamente homozigota para este traço até o grau em que, quando a variedade de geração verdadeira é auto-polinizada, uma quantidade significativa de segregação independente do traço entre a progênie não é observada. Na presente invenção, o traço surge da expressão transgênica de um ou mais  
20 polinucleotídeos isolados introduzidos em uma variedade de planta. Como também aqui usado, o termo “variedade do tipo selvagem” refere-se a um grupo de plantas que são analisadas para propósitos comparativos como uma planta de controle, em que a planta da variedade do tipo selvagem é idêntica à planta transgênica (planta transformada com um polinucleotídeo isolado de  
25 acordo com a invenção) com a exceção de que a planta da variedade do tipo selvagem não foi transformada para conter um polinucleotídeo isolado da invenção.

Como aqui definido, o termo “ácido nucleico” e “polinucleotídeo” são intercambiáveis e referem-se ao RNA ou DNA que é

linear ou ramificado, de filamento único ou duplo ou um híbrido deste. O termo também abrange híbridos de RNA/DNA. Uma molécula de ácido nucleico “isolada” é uma que é substancialmente separada de outras moléculas de ácido nucleico que estão presentes na fonte natural do ácido nucleico (isto é, sequências que codificam outros polipeptídeos). Por exemplo, um ácido nucleico clonado é considerado isolado. Um ácido nucleico também é considerado isolado se o mesmo foi alterado pela intervenção humana ou colocado em um local ou localização que não é o seu sítio natural ou se o mesmo é introduzido em uma célula pela transformação.

Além disso, uma molécula de ácido nucleico isolada, tal como uma molécula de cDNA, pode estar livre de alguns dos outros materiais celulares com os quais está naturalmente associada ou meio de cultura quando produzida pelas técnicas recombinantes ou precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizadas. Embora possa opcionalmente abranger a sequência não traduzida localizada tanto na extremidade 3’ quanto na 5’ da região codificadora de um gene, pode ser preferível remover as sequências que naturalmente flanqueiam a região codificadora no seu réplicon que ocorre naturalmente.

Como aqui usado, o termo “estresse ambiental” refere-se a uma condição sub-ótima associada com a salinidade, seca, nitrogênio, temperatura, metal, produto químico, estresses patogênicos ou oxidativos ou qualquer combinação destes. Os termos “eficiência no uso da água” e “WUE” referem-se à quantidade de matéria orgânica produzida por uma planta dividida pela quantidade de água usada pela planta na sua produção, isto é, o peso seco de uma planta em relação ao uso de água da planta. Como aqui usado, o termo “peso seco” refere-se a tudo na planta outro que não água e inclui, por exemplo, carboidratos, proteínas, óleos e nutrientes minerais.

Qualquer espécie vegetal pode ser transformada para criar uma planta transgênica de acordo com a invenção. A planta transgênica da

invenção pode ser uma planta dicotiledônea ou uma planta monocotiledônea. Por exemplo e sem limitação, as plantas transgênicas da invenção podem ser derivadas de qualquer uma das seguintes famílias de planta dicotiledônea: *Leguminosae*, incluindo plantas tais como ervilha, alfafa e soja; *Umbelliferae*,  
5 incluindo plantas tais como cenoura e aipo; *Solanaceae*, incluindo plantas tais como tomate, batata, beringela, tabaco e pimentão; *Cruciferae*, particularmente o gênero *Brassica*, que inclui plantas tais como colza, beterraba, repolho, couve-flor e brócolis); e *Arabidopsis thaliana*; *Compositae*, que inclui plantas tais como alface; *Malvaceae*, que inclui o  
10 algodão; *Fabaceae*, que inclui plantas tais como amendoim e outras. As plantas transgênicas da invenção podem ser derivadas de plantas monocotiledôneas, tais como, por exemplo, trigo, cevada, sorgo, painço, centeio, triticale, milho, arroz, aveia, *switchgrass*, *miscanthus* e cana de açúcar. As plantas transgênicas da invenção também são personificadas como  
15 árvores tais como macieira, pereira, marmeleiro, ameixeira, cerejeira, pessegueiro, de nectarina, albricoqueiro, mamoeiro, mangueira e outras espécies lenhosas incluindo árvores coníferas e decíduas tais como álamo, pinheiro, sequóia, cedro, carvalho, salgueiro e outros. Especialmente preferidas são *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, colza, soja, milho  
20 (milho), trigo, linhaça, batata e tagetes.

Como mostrado na Tabela 1, uma forma de realização da invenção é uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo da tRNA 2'-fosfotransferase. Em leveduras, a proteína Tpt1 da RNA 2'-  
25 fosfotransferase é uma proteína essencial que catalisa a etapa final da união do tRNA. Embora esta família de proteínas seja conservada em eucariotas, bactérias e *archaea*, a sua função apenas foi bem caracterizada em levedura. A união do tRNA é conservada em todos os três reinos principais, mas os mecanismos e enzimas envolvidas diferem. Estas diferenças deixam a função

exata das proteínas da RNA 2'-fosfotransferase em plantas incerta, embora a atividade enzimática tenha sido demonstrada em extratos nucleares de tabaco. Todos os membros da família da RNA 2'-fosfotransferase contêm um domínio de núcleo conservado, exemplificado pelos aminoácidos de 98 a 287 da SEQ ID NO: 2 e membros da *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Homo sapiens* são capazes de complementar o mutante *tpt1* de *Saccharomyces cerevisiae*, indicando similaridade de função.

A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifica uma tRNA 2'-fosfotransferase. Preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma tRNA 2'-fosfotransferase tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 98 a 287 da SEQ ID NO: 2. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma tRNA 2'-fosfotransferase tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 323 da SEQ ID NO: 2.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma quinase de proteína de controle da divisão celular 2 (CDC2). As proteínas CDC2 pertencem a uma família específica de quinases dependentes de ciclina (CDKs) em plantas habitualmente aludidas como a família CDKA. Todas as proteínas CDKA contêm um domínio da quinase de núcleo altamente conservada com um motivo PSTAIRE que é o sítio fundamental para a interação da ciclina para formar complexos de CDK-ciclina ativos. Um motivo PSTAIRE exemplar é representado como os aminoácidos de 4 a 287 da SEQ ID NO: 4. As proteínas CDKA também são submetidas à modificação pós traducional. A fosforilação das treonina 14 e tirosina 15 conservadas inativa a CDKA e a fosforilação da posição treonina 161 conservada ativa a CDKA. Em levedura estas CDKs

estão envolvidas especificamente nos controles de G1/S e G2/M. Em plantas, as CDKA's são propostas funcionar na progressão tanto da fase S quanto da M e estar envolvidas na proliferação celular e manutenção da competência da divisão celular em tecidos diferenciadores. Na *Arabidopsis thaliana* por exemplo, uma mutação do gene CDKA1 leva à letalidade gametofítica masculina e prejudica o desenvolvimento de semente pela redução do tamanho da semente.

A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma quinase de proteína CDC2. Preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína CDKA tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 4 a 287 da SEQ ID NO: 4. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína CDKA tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 294 da SEQ ID NO: 4.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de repetição rica em leucina (LRR). As LRRs são tipicamente encontradas em proteínas como repetições de 20 a 29 aminoácidos, cada uma contendo uma região conservada de 11 aminoácidos com a sequência de consenso de LXXLXLXXN/CXL com X como qualquer aminoácido e L como valina, leucina ou fenilalanina. A proteína LRR da presente invenção contém uma LRR representada pelos aminoácidos 422 a 441 da SEQ ID NO: 6. A função principal no geral aceita das LLRs é fornecer um esqueleto estrutural para a formação de interações de proteína-proteína. As proteínas contendo LLR são conhecidas por estarem envolvidas nas interações receptoras de hormônio, inibição de enzima, adesão celular, tráfico celular, resistência a doença de planta e virulência bacteriana.

A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína LRR tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 422 a 441 da SEQ ID NO: 6. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização  
5 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de LRR tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 646 da SEQ ID NO: 6.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína que liga  
10 Ran. As proteínas Ran GTPase (RanGTP) pertencem a uma subfamília de proteínas de ligação de GTP pequena que estão envolvidas no transporte nucleocitoplásmico e estão envolvidas no controle das funções nucleares por todo o ciclo celular. As proteínas que ligam Ran 1 (RanBP1s) são proteínas citoplásmicas que formam um complexo com a forma GTP de RanGTP. O  
15 domínio de ligação de RanBP1s que interage com RanGTP foi identificado e é representado pelos aminoácidos de 51 a 172 da SEQ ID NO: 8. A formação deste complexo RanGTP-RanBP1 é chave para promover a dissociação inicial de RanGTP a partir dos fatores de transporte que são exportados do núcleo para o citoplasma.

20 A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique a proteína RanBP1 tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 51 a 172 da SEQ ID NO: 8. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína RanBP1 tendo  
25 uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 213 da SEQ ID NO: 8.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de divisão de plastídeo. As proteínas de divisão de plastídeo FtsZ são caracterizadas

pelos domínios representados pelos aminoácidos 139 a 332 da SEQ ID NO: 10. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína de divisão de plastídeo tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 139 a 332 da SEQ ID NO: 10. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de divisão de plastídeo tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 490 da SEQ ID NO: 10.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína carreadora do substrato mitocondrial. As proteínas carreadoras do substrato mitocondrial são caracterizadas pelos domínios representados pelos aminoácidos de 1 a 98 da SEQ ID NO: 12. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína carreadora do substrato mitocondrial tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 98 da SEQ ID NO: 12. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína carreadora do substrato mitocondrial tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 297 da SEQ ID NO: 12.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de MADS-box. Os domínios de ligação e dimerização de DNA de fatores de transcrição do tipo SRF compreendem os domínios MADS-box representados pelos aminoácidos de 9 a 59 da SEQ ID NO: 14. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína do fator de transcrição do tipo SRF que compreende um domínio MADS-box tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 9 a 59

da SEQ ID NO: 14. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de MADS-box tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 187 da SEQ ID NO: 14.

5                   Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína da adenosina quinase 1 (ADK-1). A família pfkB de carboidrato quinases designada ADK-1 compreende domínios representados pelos aminoácidos de  
10 23 a 339 da SEQ ID NO: 16. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína de ADK-1 compreendendo um domínio tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 23 a 339 da SEQ ID NO: 16. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que  
15 codifica uma proteína de ADK-1 tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 343 da SEQ ID NO: 16.

                  Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de dedo de  
20 zinco 6 (ZF-6). Estas proteínas compreendem um domínio IBR representado pelos aminoácidos de 210 a 272 da SEQ ID NO: 18. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína ZF-6 compreendendo um domínio tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 210 a 272 da SEQ ID NO: 18.  
25 Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína ZF-6 tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 594 da SEQ ID NO: 18.

                  Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que

compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína da subunidade reguladora da quinase dependente de ciclina (CDK). Estas proteínas compreendem um domínio representado pelos aminoácidos de 1 a 72 da SEQ ID NO: 20. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína CDK compreendendo um domínio tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 72 da SEQ ID NO: 20. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína CDK tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 91 da SEQ ID NO: 20.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de dedo de zinco 7 (ZF-7). Estas proteínas compreendem um domínio do tipo C3HC4 representado pelos aminoácidos de 20 a 60 da SEQ ID NO: 22. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína ZF-7 compreendendo um domínio tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 20 a 60 da SEQ ID NO: 22. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína ZF-7 tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 347 da SEQ ID NO: 22.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de ligação de MAR. A planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de ligação de MAR tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 814 da SEQ ID NO: 24.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma

planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína receptora da repetição rica em leucina quinase. A proteína de LRP-2 da presente invenção contém diversas LRRs, representadas pelos aminoácidos de 111 a 133 da SEQ ID NO: 26, aminoácidos de 135 a 158 da SEQ ID NO: 26, aminoácidos de 160 a 182 da SEQ ID NO: 26 e aminoácidos de 184 a 207 da SEQ ID NO: 26. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína LRP-2 tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 111 a 133 da SEQ ID NO: 26, aminoácidos de 135 a 158 da SEQ ID NO: 26, aminoácidos de 160 a 182 da SEQ ID NO: 26 e aminoácidos de 184 a 207 da SEQ ID NO: 26. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína LRR tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 251 da SEQ ID NO: 26.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da quinase de proteína fitocrômica. A planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da quinase de proteína fitocrômica tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 689 da SEQ ID NO: 28.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína relacionada com a sinaptobrevina. Estas proteínas compreendem um domínio da sinaptobrevina representado pelos aminoácidos de 127 a 215 da SEQ ID NO: 30. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína relacionada com a sinaptobrevina compreendendo um domínio tendo uma sequência que compreende os

aminoácidos de 127 a 215 da SEQ ID NO: 30. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína relacionada com a sinaptobrevina tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 222 da SEQ ID NO: 30.

5                   Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína B de calcineurina. Em plantas, uma família de proteínas foi descoberta que são proteínas sensoriais de cálcio com similaridade tanto com a subunidade B reguladora de  
10                   calcineurina quanto com os sensores de cálcio neuronais dos animais. Estas proteínas foram chamadas de proteínas equivalentes à calcineurina B (CBL). Estas proteínas CBL contêm motivos de controle de EF que são estruturalmente importantes para a ligação de cálcio e interagem especificamente com um grupo de proteína quinases Ser/Thr, designada como  
15                   quinases de proteína que interagem com CBL (CIPK). CIPKs mais provavelmente representam alvos de cálcio sentidos e transduzidos pelas proteínas de CBL.

                  Cada controle de EF consiste de uma alça de 12 aminoácidos flanqueados pelas duas hélices alfa, que liga um único íon cálcio por  
20                   intermédio do domínio de alça. Estas proteínas também foram descobertas ligar íons magnésio. As proteínas com quanto motivos de controle EF usualmente têm dois domínios estruturais, cada um formado por um par de motivos de controle de EF separados por um ligador flexível. A ligação do íon metálico à proteína de controle EF leva a uma mudança conformacional que  
25                   expõem uma superfície hidrofóbica, que se liga a uma sequência alvo. Muitas proteínas contendo controles EF também contêm um sítio de miristoilação no terminal N, com a sequência de consenso de MGXXXS/T, com X representando qualquer aminoácido. A miristoilação neste sítio promove a interação de proteína-proteína ou proteína-membrana. Este sítio de

miristoilação não está presente na sequência EST321 (SEQ ID NO: 32), potencialmente indicando que a proteína EST321 poderia pertencer a uma classe diferente de proteínas contendo domínio de controle EF.

5 A proteína da subunidade B da calcineurina da presente invenção contém diversos motivos de controle EF, representados pelos aminoácidos de 37 a 65 da SEQ ID NO: 32, aminoácidos de 106 a 134 da SEQ ID NO: 32 e aminoácidos de 142 a 170 da SEQ ID NO: 32. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína da subunidade B da calcineurina tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 37 a 65 da SEQ ID NO: 32, aminoácidos de 106 a 134 da SEQ ID NO: 32 e aminoácidos de 142 a 170 da SEQ ID NO: 32. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da subunidade B da calcineurina tendo uma sequência que  
10 compreende os aminoácidos de 1 a 182 da SEQ ID NO: 32.  
15

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína relacionada com a caleosina. As caleosinas são uma família de proteínas que são presumivelmente moduladas pela ligação de cálcio e estado de fosforilação e são consideradas como estando envolvidas na fusão de membranas e corpos oleosos. Estas proteínas contêm diversos domínios, uma região de terminal N com um único motivo de controle de EF que liga íon cálcio, uma região hidrofóbica central com uma âncora de membrana potencial e uma região de terminal C com sítios de fosforilação da quinase de proteína conservados. A presença apenas de um único motivo de controle EF é inusitado para a maioria das proteínas contendo controle EF. Foi postulado que este domínio de controle EF único pode interagir com a superfície de membrana ou uma outra proteína de modo a formar a interação de domínio de controle EF duplo  
20  
25

coordenado encontrado na maioria das outras proteínas de controle EF.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína relacionada com a caleosina. Estas proteínas compreendem um domínio da caleosina representado pelos aminoácidos de 26 a 229 da SEQ ID NO: 34. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína relacionada com a caleosina compreendendo um domínio tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 26 a 229 da SEQ ID NO: 34. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína relacionada com a caleosina tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 239 da SEQ ID NO: 34.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da histona desacetilase. Nucleossomas consistem de histonas e DNA, que são essenciais para empacotar DNA em cromossomas. A lisina nas extremidades de terminal N de histonas de núcleo são os sítios predominantes para a acetilação e metilação e as histona desacetilases catalisam a remoção do grupo acetila destas cadeias laterais de lisina. Os genes ativos são preferencialmente associados com histonas altamente acetiladas e genes inativos são associados com histonas hipoacetiladas. A acetilação resulta na neutralização de carga de histonas e enfraquecem os contatos da histona/DNA. Em plantas, a hiperacetilação de histona está correlacionada com a atividade de gene.

As histonas são descobertas como estando associadas com complexos de multi-subunidade grande. Três famílias distintas de histona desacetilases são encontradas em plantas, a família RPD3/HDA, a família SIR2 e a família HD2 específica de planta. A família RPD3/HDA1 é

encontrada em todos os organismos eucarióticos e os membros possuem um domínio de histona desacetilase completo. Algumas proteínas da histona desacetilase possuem regiões únicas fora do domínio da histona desacetilase que pode ser importante para a função e/ou especificidade destas proteínas.

5                   As histona desacetilases da presente invenção são caracterizadas pelos seguintes domínios: dos aminoácidos 6 a 318 da SEQ ID NO: 36; dos aminoácidos 6 a 318 da SEQ ID NO: 38; dos aminoácidos 20 a 332 da SEQ ID NO: 40; dos aminoácidos 8 a 322 da SEQ ID NO: 42; dos aminoácidos 6 a 318 da SEQ ID NO: 44; dos aminoácidos 23 a 333 da SEQ ID NO: 46; dos aminoácidos 8 a 321 da SEQ ID NO: 48; dos aminoácidos 6 a 318 da SEQ ID NO: 50; dos aminoácidos 56 a 382 da SEQ ID NO: 52; e dos aminoácidos 23 a 333 da SEQ ID NO: 54.

15                   Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da histona desacetilase. A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína da histona desacetilase que compreende um domínio tendo uma sequência selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 6 a 318 da SEQ ID NO: 36; aminoácidos de 6 a 318 da SEQ ID NO: 38; aminoácidos de 20 a 332 da SEQ ID NO: 40; aminoácidos de 8 a 322 da SEQ ID NO: 42; aminoácidos de 6 a 318 da SEQ ID NO: 44; aminoácidos de 23 a 333 da SEQ ID NO: 46; aminoácidos de 8 a 321 da SEQ ID NO: 48; aminoácidos de 6 a 318 da SEQ ID NO: 50; aminoácidos de 56 a 382 da SEQ ID NO: 52; e aminoácidos de 23 a 333 da SEQ ID NO: 54. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da histona desacetilase selecionada do grupo que consiste de uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 431 da SEQ ID NO: 36; uma proteína tendo uma sequência que compreende os

aminoácidos de 1 a 426 da SEQ ID NO: 38; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 470 da SEQ ID NO: 40; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 363 da SEQ ID NO: 42; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 429 da SEQ ID NO: 44; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 518 da SEQ ID NO: 46; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 334 da SEQ ID NO: 48; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 429 da SEQ ID NO: 50; uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 417 da SEQ ID NO: 52; e uma proteína tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 519 da SEQ ID NO: 54.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de repetição rica em leucina (LRR). As LRRs são tipicamente encontradas em proteínas como repetições de 20 a 29 aminoácidos, cada uma contendo uma região conservada de 11 aminoácidos com a sequência de consenso de LXXLXLXXN/CXL com X como qualquer aminoácido e L como valina, leucina ou fenilalanina. A proteína LRR da presente invenção contém uma LRR representada pelos aminoácidos de 422 a 441 da SEQ ID NO: 56. A função principal no geral aceita das LRRs é fornecer um esqueleto estrutural para a formação de interações de proteína-proteína. As proteínas contendo LRR são conhecidas como estando envolvidas nas interações receptoras de hormônio, inibição de enzima, adesão celular, tráfico celular, resistência a doença de planta e virulência bacteriana.

A planta transgênica desta forma de realização pode compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína LRR tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 422 a 441 da SEQ ID NO:

56. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína LRR tendo uma sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 698 da SEQ ID NO: 56.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma  
5 planta transgênica transformada com um cassete de expressão que  
compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de  
repetição rica em leucina (LRR). As LRRs são tipicamente encontradas em  
proteínas como repetições de 20 a 29 aminoácidos, cada uma contendo uma  
região conservada de 11 aminoácidos com a sequência de consenso de  
10 LXXLXLXXN/CXL com X como qualquer aminoácido e L como valina,  
leucina ou fenilalanina. A proteína LRR da presente invenção contém uma  
LRR representada pelos aminoácidos de 422 a 441 da SEQ ID NO: 58. A  
função principal no geral aceita das LRRs é fornecer um esqueleto estrutural  
para a formação de interações de proteína-proteína. As proteínas contendo  
15 LRR são conhecidas por estarem envolvidas em interações receptoras de  
hormônio, inibição de enzima, adesão celular, tráfico celular, resistência a  
doença de planta e virulência bacteriana.

A planta transgênica desta forma de realização pode  
compreender qualquer polinucleotídeo que codifique uma proteína LRR tendo  
20 uma sequência que compreende os aminoácidos de 422 a 441 da SEQ ID NO:  
58. Mais preferivelmente, a planta transgênica desta forma de realização  
compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína LRR tendo uma  
sequência que compreende os aminoácidos de 1 a 665 da SEQ ID NO: 58.

A invenção fornece ainda uma semente produzida por uma  
25 planta transgênica que expressa os polinucleotídeos listados na Tabela 1, em  
que a semente contém o polinucleotídeo e em que a planta é de geração  
verdadeira quanto ao crescimento e/ou rendimento aumentados sob condições  
normais e/ou de estresse e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental  
quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da planta. A

invenção também fornece um produto produzido pelas ou das plantas transgênicas que expressam o polinucleotídeo, suas partes de planta ou suas sementes. O produto pode ser obtido usando vários métodos bem conhecidos na técnica. Como aqui usada, a palavra “produto” inclui, mas não é limitado a, um gênero alimentício, ração, um suplemento alimentar, suplemento de ração, cosmético ou produto farmacêutico. Os gêneros alimentícios são considerados como composições usadas para nutrição ou para a nutrição suplementar. As rações de animal e suplementos de ração de animal, em particular, são consideradas como gêneros alimentícios. A invenção fornece ainda um produto agrícola produzido por qualquer uma das plantas transgênicas, partes de planta e sementes de planta. Os produtos agrícolas incluem, mas não são limitados a, extratos de planta, proteínas, aminoácidos, carboidratos, gorduras, óleos, polímeros, vitaminas e outros.

Em uma forma de realização preferida, um polinucleotídeo isolado da invenção compreende um polinucleotídeo tendo uma sequência selecionada do grupo que consiste das sequências de polinucleotídeo listadas na Tabela 1. Estes polinucleotídeos podem compreender sequências da região codificadora, assim como sequências 5' não traduzidas e sequências 3' não traduzidas. A Tabela 2 descreve posições de partida e término potenciais das regiões codificadoras dos polinucleotídeos de *P. patens* da invenção e matrizes de leitura aberta alternativas que podem estar presentes nos filamentos de sentido ou de anti-sentido destes polinucleotídeos. Alternativamente, os polinucleotídeos da invenção podem compreender apenas a região codificadora das sequências de nucleotídeo listadas na Tabela 1, como indicado na Tabela 2 ou os polinucleotídeos podem conter fragmentos genômicos inteiros isolados do DNA genômico. Assim a invenção também é personificada como um polinucleotídeo isolado tendo uma sequência selecionada do grupo que consiste das sequências listadas na Tabela 1 ou Tabela 2.

Tabela 2

Nome do Gene	ID do GENE	SEQ ID NO	ORFs	Número de Orf	Filamento	Posição de partida	Posição final
PpTPT-1	EST 214	1	1	1	sentido	113	1104
PpCDC2-1	EST 280	3	2	1	sentido	37	921
PpCDC2-1	EST 280	3	2	2	anti-sentido	380	42
PpLRP-1	EST 298a	5	1	1	sentido	144	2084
	EST 298b	55	1	1	sentido	143	2236
	EST 298c	57	1	1	sentido	1	1998
PpRBP-1	EST 300	7	1	1	sentido	55	696
PpPD-1	EST 362	9	2	1	sentido	47	1519
PpPD-1	EST 362	9	2	2	anti-sentido	1197	604
PpMSC-1	EST 378	11	2	1	sentido	453	1346
PpMSC-1	EST 378	11	2	2	anti-sentido	1314	1027
PpMBP-1	EST 398	13	1	1	sentido	33	878
PpAK-1	EST 407	15	3	1	sentido	25	1056
PpAK-1	EST 407	15	3	2	sentido	381	632
PpAK-1	EST 407	15	3	3	anti-sentido	506	270
PpZF-6	EST 458	17	1	1	sentido	126	1910
PpCDK-1	EST 479	19	2	1	sentido	248	523
PpCDK-1	EST 479	19	2	2	anti-sentido	304	104
PpZF-7	EST 520	21	2	1	sentido	276	1319
PpZF-7	EST 520	21	2	2	sentido	583	813
PpMFP-1	EST 544	23	1	1	sentido	127	2571
PpLRP-2	EST 545	25	3	1	sentido	225	980
PpLRP-2	EST 545	25	3	2	sentido	416	694
PpLRP-2	EST 545	25	3	3	anti-sentido	469	167
PpPPK-1	EST 549	27	1	1	sentido	145	2214
PpSRP-1	EST 554	29	1	1	sentido	20	688
PpCBL-1	EST 321	31	2	1	sentido	43	591
PpCBL-1	EST 321	31	2	2	sentido	803	1171
PpCBL-2	EST 416	33	1	1	sentido	16	735
PpHD-1	EST 468	35	2	1	sentido	166	1461
PpHD-1	EST 468	35	2	2	anti-sentido	420	175

Um polinucleotídeo da invenção pode ser isolado usando técnicas da biologia molecular padrão e a informação de sequência aqui fornecida. Por exemplo, cDNAs de *P. patens* da invenção foram isolados a partir de uma biblioteca de *P. patens* usando uma porção das sequências aqui divulgadas. Os iniciadores de oligonucleotídeo sintético para a amplificação pela reação da cadeia da polimerase podem ser planejados com base na sequência de nucleotídeo mostrada na Tabela 1. Uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser amplificada usando cDNA ou, alternativamente, DNA genômico, como um padrão e iniciadores de oligonucleotídeo apropriados de acordo com as técnicas de amplificação da

PCR padrão. A molécula de ácido nucleico assim amplificada pode ser clonada em um vetor apropriado e caracterizada pela análise de sequência de DNA. Além disso, oligonucleotídeos que correspondem às sequências de nucleotídeo listadas na Tabela 1 podem ser preparadas pelas técnicas sintéticas padrão, por exemplo, usando um sintetizador de DNA automatizado.

“Homólogos” são aqui definidos como dois ácidos nucleicos ou polipeptídeos que têm sequências de nucleotídeo ou aminoácido similares ou substancialmente idênticas, respectivamente. Homólogos incluem variantes alélicas, análogos e ortólogos, como definido abaixo. Como aqui usado, o termo “análogos” referem-se a dois ácidos nucleicos que têm a mesma ou função similar, mas que evoluíram separadamente em organismos não relacionados. Como aqui usado, o termo “ortólogos” refere-se a dois ácidos nucleicos de espécies diferentes, mas que evoluíram de um gene ancestral comum pela especiação. O termo homólogo abrange ainda moléculas de ácido nucleico que diferem de uma das sequências de nucleotídeo mostradas na Tabela 1 devido à degenerescência do código genético e assim codificam o mesmo polipeptídeo. Como aqui usado, uma molécula de ácido nucleico “que ocorre naturalmente” refere-se a uma molécula de RNA ou DNA tendo uma sequência de nucleotídeo que ocorre na natureza (por exemplo, codifica um polipeptídeo natural).

Para determinar a identidade de sequência percentual de duas sequências de aminoácido (por exemplo, uma das sequências de polipeptídeo da Tabela 1 e um homólogo desta), as sequências são alinhadas com propósitos de comparação ótima (por exemplo, intervalos podem ser introduzidos na sequência de um polipeptídeo para alinhamento ótimo com o outro polipeptídeo ou ácido nucleico). Os resíduos de aminoácido nas posições de aminoácido correspondentes são depois comparados. Quando uma posição em uma sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido

como a posição correspondente na outra sequência então as moléculas são idênticas nesta posição. O mesmo tipo de comparação pode ser fabricada entre duas sequências de ácido nucleico.

Preferivelmente, os homólogos, análogos e ortólogos de aminoácido isolados dos polipeptídeos da presente invenção são pelo menos  
5 cerca de 50 a 60 %, preferivelmente pelo menos cerca de 60 a 70 % e mais preferivelmente pelo menos cerca de 70 a 75 %, 75 a 80 %, 80 a 85 %, 85 a 90 % ou 90 a 95 % e o mais preferivelmente pelo menos cerca de 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais idênticos a uma sequência de aminoácido inteira  
10 identificada na Tabela 1. Em uma outra forma de realização preferida, um homólogo de ácido nucleico isolado da invenção compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos cerca de 40 a 60 %, preferivelmente pelo menos cerca de 60 a 70 %, mais preferivelmente pelo menos cerca de 70 a 75 %, 75 a 80 %, 80 a 85 %, 85 a 90 % ou 90 a 95 % e ainda mais  
15 preferivelmente pelo menos cerca de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais idêntica a uma sequência de nucleotídeo mostrada na Tabela 1 ou Tabela 2.

Para os propósitos da invenção, a identidade de sequência percentual entre duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo é determinada usando o pacote de software Vector NTI 9.0 (PC) (Invitrogen,  
20 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA92008). Uma penalidade de abertura de intervalo de 15 e uma penalidade de extensão de intervalo de 6,66 são usadas para determinar a identidade percentual de dois ácidos nucleicos. Uma penalidade de abertura de intervalo de 10 e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,1 são usadas para determinar a identidade percentual de dois  
25 polipeptídeos. Todos os outros parâmetros são definidos nos ajustes de default. Para os propósitos de um alinhamento múltiplo (o algoritmo Clustal W), a penalidade de abertura de intervalo é 10 e a penalidade de extensão de intervalo é 0,05 com matriz blosum62. Deve ser entendido que para os propósitos de determinar a identidade de sequência quando da comparação de

uma sequência de DNA com uma sequência de RNA, um nucleotídeo de timidina é equivalente a um nucleotídeo de uracila.

As moléculas de ácido nucleico que correspondem aos homólogos, análogos e ortólogos dos polipeptídeos listados na Tabela 1 podem ser isolados com base na sua identidade com os ditos polipeptídeos, usando os polinucleotídeos que codificam os respectivos polipeptídeos ou iniciadores com base neles, como sondas de hibridização de acordo com técnicas de hibridização padrão sob condições de hibridização estringentes. Como aqui usado com respeito à hibridização para DNA a uma mancha de DNA, o termo “condições estringentes” refere-se à hibridização durante a noite a 60° C em 10X solução de Denhart, 6X SSC, 0,5 % de SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. As manchas são lavadas sequencialmente a 62° C por 30 minutos de cada vez em 3X SSC/0,1 % de SDS, seguido por 1X SSC/0,1 % de SDS e finalmente 0,1X SSC/0,1 % de SDS. Como também aqui usado, em uma forma de realização preferida, a frase “condições estringentes” refere-se à hibridização em uma solução 6X SSC a 65° C. Em uma outra forma de realização, “condições altamente estringentes” refere-se à hibridização durante a noite a 65° C em 10X solução de Denhart, 6X SSC, 0,5 % de SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. As manchas são lavadas sequencialmente a 65° C por 30 minutos de cada vez em 3X SSC/0,1 % de SDS, seguido por 1X SSC/0,1 % de SDS e finalmente 0,1X SSC/0,1 % de SDS. Os métodos para as hibridizações de ácido nucleico estão descritas em Meinkoth e Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138: 267-284; bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Ausubel *et al.*, eds., Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1995; e Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hibridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, Nova Iorque, 1993). Preferivelmente, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção que

hibridiza sob condições estridentes ou altamente estridentes a uma sequência de nucleotídeo listada na Tabela 1 corresponde a uma molécula de ácido nucleico que ocorre naturalmente.

5 Existe uma variedade de métodos que podem ser usados para produzir bibliotecas de homólogos potenciais de uma sequência de oligonucleotídeo degenerada. A síntese química de uma sequência de gene degenerada pode ser realizada em um sintetizador de DNA automático e o gene sintético é depois ligado em um vetor de expressão apropriado. O uso de um conjunto degenerado de genes permite o fornecimento, em uma mistura, 10 de todas as sequências que codificam o conjunto desejado de sequências potenciais. Os métodos para sintetizar oligonucleotídeos degenerados são conhecidos na técnica (Ver, por exemplo, Narang, 1983, *Tetrahedron* 39: 3; Itakura *et al.*, 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura *et al.*, 1984, *Science* 198: 1056; Ike *et al.*, 1983, *Nucleic Acids Res.* 11: 477).

15 Adicionalmente, os ácidos nucleicos otimizados podem ser criados. Preferivelmente, um ácido nucleico otimizado codifica um polipeptídeo que tem uma função similar àquela dos polipeptídeos listados na Tabela 1 e/ou modula um crescimento e/ou rendimento da planta sob condições normais e/ou limitadas em água e/ou tolerância a um estresse 20 ambiental e mais preferivelmente aumenta um crescimento e/ou rendimento sob condições normais e/ou limitadas em água e/ou tolerância a um estresse ambiental da planta na sua super expressão na planta. Como aqui usado, “otimizado” refere-se a um ácido nucleico que é geneticamente engendrado para aumentar a sua expressão em uma dada planta ou animal. Para fornecer 25 ácidos nucleicos otimizados na planta, a sequência de DNA do gene pode ser modificado para: 1) compreender códons preferidos pelos genes vegetais altamente expressados; 2) compreender um teor de A+T na composição de base de nucleotídeo em relação àquela substancialmente encontrada em plantas; 3) formar uma sequência de iniciação de planta; 4) eliminar as

sequências que causam desestabilização, poliadenilação inadequada, degradação e terminação de RNA ou que formam grampos de cabelo de estrutura secundária ou sítios de união de RNA; ou 5) eliminação de matrizes de leitura aberta de anti-sentido. A expressão aumentada de ácidos nucleicos em plantas pode ser obtida pela utilização da frequência de distribuição do uso de códon em plantas no geral ou em uma planta particular. Os métodos para a otimização da expressão de ácido nucleico em plantas podem ser encontrados na EPA 0359472; EPA 0385962; Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 91/16432; Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.380.831; Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.436.391; Perlack *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324-3328; e Murray *et al.*, 1989, Nucleic Acids Res. 17: 477-498.

Um polinucleotídeo isolado da invenção pode ser otimizado tal que a sua frequência de distribuição do uso de códon desvia, preferivelmente, não mais do que 25 % daquele de genes vegetais altamente expressados na planta e, mais preferivelmente, não mais do que cerca de 10 %. Além disso, consideração é dada ao teor de G+C percentual da terceira base degenerada (os monocotiledôneas parecem favorecer G+C nesta posição, ao passo que os dicotiledôneas não). Também é reconhecido que o nucleotídeo XCG (onde X é A, T, C ou G) é o códon menos preferido em dicotiledôneas, ao passo que o códon XTA é evitado tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Os ácidos nucleicos otimizados desta invenção também preferivelmente têm índices de evitação dos dubletos CG e TA que intimamente se aproximam daqueles da planta hospedeira escolhida. Mais preferivelmente, estes índices desviam daqueles do hospedeiro em não mais do que cerca de 10 a 15 %.

A invenção fornece ainda um vetor de expressão recombinante isolado que compreende um polinucleotídeo como descrito acima, em que a expressão do vetor em uma célula hospedeira resulta no crescimento e/ou rendimento aumentado da planta sob condições normais ou limitadas em água

e/ou tolerância aumentada ao estresse ambiental quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da célula hospedeira. Os vetores de expressão recombinantes da invenção compreendem um ácido nucleico da invenção em uma forma adequada para a expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira, o que significa que os vetores de expressão recombinantes incluem uma ou mais sequências reguladoras, selecionadas com base nas células hospedeiras a serem usadas para a expressão, que é operativamente ligada à sequência de ácido nucleico a ser expressada. Como aqui usado com respeito a um vetor de expressão recombinante, “operativamente ligado” é intencionado a significar que a sequência de nucleotídeo de interesse está ligada à(s) sequência(s) reguladora(s) em uma maneira que permita a expressão da sequência de nucleotídeo (por exemplo, em uma célula hospedeira bacteriana ou vegetal quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo “sequência reguladora” é intencionada a incluir promotores, realçadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação). Tais sequências reguladoras são bem conhecidas na técnica. As sequências reguladoras incluem aquelas que direcionam a expressão constitutiva de uma sequência de nucleotídeo em muitos tipos de células hospedeiras e aquelas que direcionam a expressão da sequência de nucleotídeo apenas em certas células hospedeiras ou sob certas condições. Será avaliado por aqueles habilitados na técnica que o planejamento do vetor de expressão pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão do polipeptídeo desejado, etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos em células hospedeiras para produzir deste modo polipeptídeos codificados pelos ácidos nucleicos como aqui descritos.

A expressão de gene vegetal deve estar operativamente ligada a um promotor apropriado para conferir expressão de gene em uma maneira

conveniente, específica de célula ou específica de tecido. Os promotores úteis nos cassetes de expressão da invenção incluem qualquer promotor que seja capaz de iniciar a transcrição em uma célula vegetal. Tais promotores incluem, mas não são limitados àqueles que podem ser obtidos de plantas, vírus vegetais e bactérias que contêm genes que são expressados em plantas, tais como *Agrobacterium* e *Rhizobium*.

O promotor pode ser constitutivo, indutível, preferido do estágio de desenvolvimento, preferido pelo tipo de célula, preferido de tecido ou preferido de órgão. Os promotores constitutivos são ativos sob a maioria das condições. Os exemplos de promotores constitutivos incluem os promotores 19S e 35S do CaMV (Odell *et al.*, 1985, Nature 313: 810-812), o promotor 35S da CaMV sX (Kay *et al.*, 1987, Science 236: 1299-1302) o promotor Sep1, o promotor da actina do arroz (McElroy *et al.*, 1990, Plant Cell 2: 163-171), o promotor da actina de *Arabidopsis*, o promotor da ubiquitina (Christensen *et al.*, 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675-689), pEmu (Last *et al.*, 1991, Theor. Appl. Genet. 81: 581-588), o promotor 35S do vírus mosaico da escrofulária, o promotor Smas (Velten *et al.*, 1984, EMBO J 3: 2723-2730), o super promotor (Patente U.S. Nº 5.955.646), o promotor GRP1-8, o promotor da cinamil álcool desidrogenase (Patente U.S. Nº 5.683.439), promotores do T-DNA de *Agrobacterium*, tais como manopina sintase, nopalina sintase e octopina sintase, o promotor da subunidade pequena da ribulose bifosfato carboxilase (ssuRUBISCO) e outros.

Os promotores indutíveis são preferencialmente ativos sob certas condições ambientais, tais como a presença ou ausência de um nutriente ou metabólito, calor ou frio, luz, ataque de patógeno, condições anaeróbicas e outros. Por exemplo, o promotor hsp80 de *Brassica* é induzido pelo choque térmico; o promotor PPDK é induzido pela luz; os promotores PR-1 do tabaco, *Arabidopsis* e milho são indutíveis pela infecção com um patógeno; e o promotor Adh1 é induzido pela hipoxia e estresse ao frio. A

expressão de gene vegetal também pode ser facilitada por intermédio de um promotor indutível (Para uma revisão, ver Gatz, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 89-108). Os promotores quimicamente indutíveis são especialmente adequados se a expressão de gene é desejada ocorrer em uma maneira específica de tempo. Os exemplos de tais promotores são um promotor indutível pelo ácido salicílico (Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 95/19443), um promotor indutível pela tetraciclina (Gatz *et al.*, 1992, *Plant J.* 2: 397-404) e um promotor indutível pelo etanol (Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 93/21334).

10                   Em uma forma de realização preferida da presente invenção, o promotor indutível é um promotor indutível pelo estresse. Para os propósitos da invenção, os promotores indutíveis pelo estresse são preferencialmente ativos sob um ou mais dos seguintes estresses: condições subótimas associadas com salinidade, seca, nitrogênio, temperatura, metal, produto químico, estresses patogênicos e oxidativo. Os promotores indutíveis pelo estresse incluem, mas não são limitados a, Cor78 (Chak *et al.*, 2000, *Plant* 210: 875-883; Hovath *et al.*, 1993, *Plant Physiol.* 103: 1047-1053), Cor15a (Artus *et al.*, 1996, *PNAS* 93(23): 13404-09), Rci2A (Medina *et al.*, 2001, *Plant Physiol.* 125: 1655-66; Nilander *et al.*, 2001, *Plant Mol. Biol.* 45: 341-52; Navarre e Goffeau, 2000, *EMBO J.* 19: 2515-24; Capel *et al.*, 1997, *Plant Physiol.* 115: 569-76), Rd22 (Xiong *et al.*, 2001, *Plant Cell* 13: 2063-83; Abe *et al.*, 1997, *Plant Cell* 9: 1859-68; Iwasaki *et al.*, 1995, *Mol. Gen. Genet.* 247: 391-8), cDet6 (Lang e Palve, 1992, *Plant Mol. Biol.* 20: 951-62), ADH1 (Hoeren *et al.*, 1998, *Genetics* 149: 479-90), KAT1 (Nakamura *et al.*, 1995, *Plant Physiol.* 109: 371-4), KST1 (Müller-Röber *et al.*, 1995, *EMBO* 14: 2409-16), Rha1 (Terry *et al.*, 1993, *Plant Cell* 5: 1761-9; Terry *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 299(3): 287-90), ARSK1 (Atkinson *et al.*, 1997, Acesso no GenBank # L22302 e Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 97/20057), PtxA (Plesch *et al.*, Acesso no GenBank # X67427), SbHRGP3 (Ahn *et al.*, 1996, *Plant Cell* 8:

1477-90), GH3 (Liu *et al.*, 1994, *Plant Cell* 6: 645-57), o promotor do gene PRP1 indutível por patógeno (Ward *et al.*, 1993, *Plant. Mol. Biol.* 22: 361-366), o promotor hsp80 indutível por calor do tomate (Patente U.S. Nº 5187267), o promotor da alfa-amilase indutível pelo frio da batata (Pedido PCT Nº WO 96/12814) ou o promotor pinII indutível por fermento (Patente Européia Nº 375091). Para outros exemplos de promotores indutíveis por seca, frio e sal, tais como o promotor RD29A, ver Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1993, *Mol. Gen. Genet.* 236: 331-340.

Os promotores preferidos do estado de desenvolvimento são preferencialmente expressados em certos estágios de desenvolvimento. Os promotores preferidos de tecido e órgão incluem aqueles que são preferencialmente expressados em certos tecidos ou órgãos, tais como folhas, raízes, sementes ou xilem. Os exemplos de promotores preferidos de tecido e preferidos de órgão incluem, mas não são limitados a promotores preferidos de fruta, preferidos de óvulo, preferidos de tecido masculino, preferidos de semente, preferidos de tegumento, preferidos de tubérculo, preferidos de talo, preferidos de pericarpo, preferidos de folha, preferidos de estigma, preferidos de pólen, preferidos de antera, preferidos de pétala, preferidos de sépala, preferidos de pedicelo, preferidos de siliqua, preferidos de caule, preferidos de raiz e outros. Os promotores preferidos de semente são preferencialmente expressados durante o desenvolvimento e/ou germinação da semente. Por exemplo, promotores preferidos de semente podem ser preferidos de embrião, preferidos de endosperma e preferidos de revestimento de semente (Ver Thompson *et al.*, 1989, *BioEssays* 10: 108). Os exemplos de promotores preferidos de semente incluem, mas não são limitados a, celulose sintase (celA), Cim1, gama-zeína, globulina-1, 19 kD zeína do milho (cZ19B1) e outros.

Outros promotores preferidos de tecido ou preferidos de órgão adequados incluem o promotor do gene napin da colza (Patente U.S. Nº

5.608.152), o promotor USP da *Vicia faba* (Baeumlein *et al.*, 1991, Mol. Gen. Genet. 225(3): 459-67), o promotor da oleosina de *Arabidopsis* (Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 98/45461), o promotor da faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.504.200), o promotor Bce4 de *Brassica* (Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 5 91/13980) ou o promotor B4 de legumina (LeB4; Baeumlein *et al.*, 1992, Plant Journal, 2(2): 233-9), assim como promotores que conferem a expressão específica de semente em plantas monocotiledôneas como milho, cevada, trigo, centeio, arroz, etc. os promotores adequados para mencionar são o promotor dos genes lpt2 ou lpt1 da cevada (Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 95/15389 e 10 Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 95/23230) ou aqueles descritos no Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 99/16890 (promotores do gene da hordeína da cevada, gene da glutelina do arroz, gene da orizina do arroz, gene da prolamina do arroz, gene da gliadina do trigo, gene da glutelina do trigo, gene da glutelina da aveia, gene da casirina do sorgo e gene da secalina do centeio).

15                   Outros promotores úteis nos cassetes de expressão da invenção incluem, mas não são limitados ao promotor da proteína de ligação da clorofila a/b maior, promotores da histona, o promotor Ap3, o promotor da  $\beta$ -conglucina, o promotor de napina, o promotor da lectina da soja, o promotor da zeína de 15 kD do milho, o promotor da zeína de 22 kD, o promotor da 20 zeína de 27 kD, o promotor da g-zeína, os promotores ceroso, encolhido 1, encolhido 2 e bronze, o promotor Zm13 (Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.086.169), os promotores da poligalacturonase do milho (PG) (Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.412.085 e 5.545.546) e o promotor SGB6 (Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.470.359), assim como promotores sintéticos ou outros naturais.

25                   Flexibilidade adicional na expressão do gene heterólogo de controle em plantas pode ser obtida usando-se domínios de ligação de DNA e elementos de resposta de fontes heterólogas (isto é, domínios de ligação de DNA de fontes que não de planta). Um exemplo de um tal domínio de ligação de DNA heterólogo é o domínio de ligação de DNA LexA (Brent e Ptashne,

1985, Cell 43: 729-736).

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, os polinucleotídeos listados na Tabela 1 são expressados nas células vegetais a partir de plantas superiores (por exemplo, os espermatófitos, tais como plantas de safra). Um polinucleotídeo pode ser “introduzido” em uma célula vegetal por quaisquer meios, incluindo transfecção, transformação ou transdução, eletroporação, bombardeamento de partícula, agroinfecção e outros. Os métodos adequados para transformar ou transfectar células vegetais são divulgadas, por exemplo, usando bombardeamento de partícula como apresentado nas Pats. U.S. N<sup>os</sup> 4.945.050, 5.036.006, 5.100.792, 5.302.523, 5.464.765, 5.120.657, 6.084.154 e outros. Mais preferivelmente, a semente de milho transgênica da invenção pode ser fabricada usando a transformação em *Agrobacterium*, como descrito nas Patente U.S. N<sup>os</sup> 5.591.616, 5.731.179, 5.981.840, 5.990.387, 6.162.965, 6.420.630, publicação do pedido de Patente U.S. número 2002/0104132 e outros. A transformação de soja pode ser realizada usando por exemplo uma técnica descrita na Patente Européia N<sup>o</sup> EP 0424047, Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.322.783, Patente Européia N<sup>o</sup> EP 0397 687, Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.376.543 ou Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.169.770. Um exemplo específico de transformação de trigo pode ser encontrado no Pedido PCT N<sup>o</sup> WO 93/07256. O algodão pode ser transformada usando métodos divulgados nas Patente U.S. N<sup>os</sup> 5.004.863; 5.159.135; 5.846.797 e outros. Arroz pode ser transformado usando métodos divulgados nas Patente U.S. N<sup>os</sup> 4.666.844, 5.350.688, 6.153.813, 6.333.449, 6.288.312, 6.365.807, 6.329.571 e outros. Outros métodos de transformação de planta são divulgados, por exemplo, nas Patente U.S. N<sup>os</sup> 5.932.782, 6.153.811, 6.140.553, 5.969.213, 6.020.539 e outros. Qualquer método de transformação de planta adequado para inserir um transgene em uma planta particular pode ser usado de acordo com a invenção.

De acordo com a presente invenção, o polinucleotídeo

introduzido pode ser mantido na célula vegetal estavelmente se o mesmo for incorporado em um réplicon autônomo que não cromossômico ou integrado nos cromossomas vegetais. Alternativamente, o polinucleotídeo introduzido pode estar presente em um vetor que não replica extra-cromossômico e pode ser transitoriamente expressado ou transitoriamente ativo.

Um outro aspecto da invenção diz respeito a um polipeptídeo isolado tendo uma sequência selecionada do grupo que consiste das sequências de polipeptídeo listadas na Tabela 1. Um polipeptídeo “isolado” ou “purificado” é livre de alguns dos materiais celulares quando produzidos pelas técnicas de DNA recombinante ou precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizados. A linguagem “substancialmente livre de material celular” inclui preparações de um polipeptídeo em que o polipeptídeo é separado de alguns dos componentes celulares das células em que o mesmo é natural ou recombinantemente produzido. Em uma forma de realização, a linguagem “substancialmente livre de material celular” inclui preparações de um polipeptídeo da invenção tendo menos do que cerca de 30 % (em peso seco) de polipeptídeos contaminantes, mais preferivelmente menos do que cerca de 20 % de polipeptídeos contaminantes, ainda mais preferivelmente menos do que cerca de 10 % de polipeptídeos contaminantes e o mais preferivelmente menos do que cerca de 5 % de polipeptídeos contaminantes.

A determinação de atividades e parâmetros cinéticos de enzimas é bem estabelecida na técnica. Experimentos para determinar a atividade de qualquer enzima alterada dada deve ser feita de encomenda para a atividade específica da enzima do tipo selvagem, que está bem dentro da capacidade de uma pessoa habilitada na técnica. Resumos a cerca de enzimas no geral, assim como detalhes específicos concernentes à estrutura, cinéticas, princípios, métodos, aplicações e exemplos para a determinação de muitas atividades de enzima são abundantes e bem conhecidos pela pessoa habilitada

na técnica.

A invenção também é personificada em um método de produzir uma planta transgênica que compreende pelo menos um polinucleotídeo listado na Tabela 1 ou Tabela 2, em que a expressão do polinucleotídeo na planta resulta no crescimento e/ou rendimento aumentado da planta sob condições normais e/ou limitadas em água e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da planta que compreende as etapas de: (a) introduzir em uma célula vegetal um vetor de expressão que compreende pelo menos um polinucleotídeo listado na Tabela 1 ou Tabela 2 e (b) gerar a partir da célula vegetal uma planta transgênica que expresse o polinucleotídeo, em que a expressão do polinucleotídeo na planta transgênica resulta no crescimento e/ou rendimento aumentados da planta sob condições normais ou limitadas em água e/ou tolerância aumentada ao estresse ambiental quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da planta. A célula vegetal pode ser, mas não é limitada a, um protoplasto, célula que produz gameta e uma célula que regenera em uma planta inteira. Como aqui usado, o termo “transgênico” refere-se a qualquer planta, célula vegetal, calo, tecido vegetal ou parte de planta, que contenha pelo menos um polinucleotídeo recombinante listado na Tabela 1 ou Tabela 2. Em muitos casos, o polinucleotídeo recombinante é estavelmente integrado em um cromossoma ou elemento extra-cromossômico estável, de modo que o mesmo seja passado para as gerações sucessivas.

A presente invenção também fornece um método de aumentar um crescimento e/ou rendimento da planta sob condições normais e/ou limitadas em água e/ou aumentar uma tolerância da planta a um estresse ambiental que compreende as etapas de aumentar a expressão de pelo menos um polinucleotídeo listado na Tabela 1 ou Tabela 2 na planta. A expressão de um polinucleotídeo listado na Tabela 1 ou Tabela 2 pode ser aumentada por

qualquer método conhecido por aqueles de habilidade na técnica.

O efeito da modificação genética sobre o crescimento de planta e/ou rendimento e/ou tolerância ao estresse pode ser avaliado pelo crescimento da planta modificada sob condições normais e/ou menos do que adequadas e depois analisar as características de crescimento e/ou metabolismo da planta. Tais técnicas de análise são bem conhecidas por uma pessoa habilitada na técnica e incluem peso seco, peso úmido, síntese de polipeptídeo, síntese de carboidrato, síntese de lipídeo, taxas de evapotranspiração, rendimento de planta e/ou safra geral, florescimento, reprodução, plantio de semente, crescimento de raiz, taxas de respiração, taxas de fotossíntese, composição de metabólito, etc., usando métodos conhecidos por aqueles de habilidade na biotecnologia.

A invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não deve ser interpretados de nenhum modo como impondo limitações no seu escopo.

#### EXEMPLO 1 - Identificação de Matrizes de Leitura Aberta de *P. patens*

As bibliotecas de cDNA feitas a partir de plantas da espécie *P. patens* (Hedw.) B.S.G. da coleção da seção de estudos genéticos da University of Hamburg foram sequenciadas usando métodos padrão. As plantas originadas da cepa 16/14 coletada pela H.L.K. Whitehouse em Gransden Wood, Huntingdonshire (Inglaterra), que foi subcultivada a partir de um esporo por Engel (1968, Am. J. Bot. 55: 438-446).

As sequências foram processadas e anotadas usando o pacote de software EST-MAX comercialmente fornecido pela Bio-Max (Munich, Alemanha). O programa incorpora praticamente todos os métodos de bioinformática importantes para a caracterização funcional e estrutural das sequências de proteína. Para referência, ver o sítio da web em [pedant.mips.biochem.mpg.de](http://pedant.mips.biochem.mpg.de). Os algoritmos mais importantes incorporados

em EST-MAX são: FASTA (Pesquisas de base de dados de sequência muito sensíveis com estimativas de significância estatística; Pearson, 1990, *Methods Enzymol.* 183: 63-98); BLAST (Pesquisas de base de dados de sequência muito sensíveis com estimativas de significância estatística; Altschul *et al.*, 5 1990, *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10); PREDATOR (Prognóstico de estrutura secundária de alta precisão a partir de sequências únicas e múltiplas; Frishman e Argos, 1997, *Proteins* 27: 329-335); CLUSTALW (Alinhamento de sequência múltipla; Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680); TMAP (Prognóstico de região de transmembrana a 10 partir de sequências multiplamente alinhadas; Persson e Argos, 1994, *J. Mol. Biol.* 237: 182-192); ALOM2 (Prognóstico da região de transmembrana a partir de sequências únicas; Klein *et al.*, 1984, *Biochim. Biophys. Acta* 787: 221-226. Versão 2 por Dr. K. Nakai); PROSEARCH (Detecção de padrões de sequência de proteína PROSITE; Kolakowski *et al.*, 1992, *Biotechniques* 13, 15 919-921); BLIMPS (Pesquisas de similaridade contra uma base de dados de blocos sem intervalos, Wallace e Henikoff, 1992, *Comput Appl Biosci.* 8(3): 249-54); PATMAT (um programa de pesquisa e extração para as dúvidas de sequência, padrão e bloco e bases de dados, *CABIOS* 8: 249-254. Escrito por Bill Alford).

20 cDNAs parciais de *P. patens* (ESTs) foram identificados no programa de sequenciamento de EST de *P. patens* usando o programa EST-MAX através da análise BLAST. As sequências de cDNA de nucleotídeo de tamanho natural foram determinadas usando métodos conhecidos. A 25 identidade e similaridade das sequências de aminoácido das sequências de polipeptídeo divulgadas para as sequências de proteína conhecidas são mostradas nas Tabelas 2 a 19 (A comparação aos pares foi usada: penalidade de intervalo: 10; penalidade de extensão de intervalo: 0,1; matriz de contagem: blosum 62).

Tabela 3

Comparação de PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2) com as RNA 2' fosfotransferases conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
XP_550615	<i>O. sativa</i>	45,4	56,2
NP_197750	<i>A. thaliana</i>	34,1	43,0
NP_182058	<i>A. thaliana</i>	39,6	48,9
NP_594515	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21,3	29,1
NP_788477	<i>Drosophila melanogaster</i>	25,5	34,7

Tabela 4

5 Comparação de PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4) com a Proteína de Controle da Divisão Celular 2 Conhecida

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
S42049	<i>Picea abies</i>	92,9	96,3
Q40790	<i>Pinus contorta</i>	92,5	96,3
CDC2_CHERU	<i>Chenopodium rubrum</i>	91,5	95,9
Q9AUH4	<i>Populus tremula x P. tremuloides</i>	90,5	95,9
Q8W2D3	<i>Helianthus annuus</i>	89,5	95,2

Tabela 5

Comparação de PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6) com as Proteínas da Família de Repetição Rica em Leucina Conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
NP_912570	<i>O. sativa</i>	27,6	42,1
NP_921136	<i>O. sativa</i>	27,2	40,3
AAF71805	<i>A. thaliana</i>	24,4	33,6
NP_177947	<i>A. thaliana</i>	28,1	38,5
G96811	<i>A. thaliana</i>	28,8	40,3

10

Tabela 6

Comparação de PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8) com a proteína de ligação de Ran 1 conhecida

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q94K24	<i>Lycopersicon esculentum</i>	50,7	63,3
Q9LUZ8	<i>A. thaliana</i>	39,4	51,9
NP_200667	<i>A. thaliana</i>	44,3	58,3
O04149	<i>A. thaliana</i>	44,1	55,1
NP_172194	<i>A. thaliana</i>	44,4	55,1

Tabela 7

Comparação de PpPD-1 (SEQ ID NO: 10) com as proteínas ftsZ de divisão de plastídeo conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q70ZZ6	<i>P. patens</i>	100	100
Q75ZR3	<i>Nannochloris bacillaris</i>	42,6	53,0
ZP_00177632	<i>Crocospaera watsonii</i>	41,3	51,8
NP_440816	<i>Synechocystis sp.</i>	41,0	52,1
T51092	<i>Synechocystis sp.</i>	40,0	51,5

Tabela 8

5 Comparação de PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12) com proteínas carreadoras de substrato mitocondrial conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
NP_194188	<i>A. thaliana</i>	56,6	70,0
T05577	<i>A. thaliana</i>	56,7	69,8
Q66PX4	<i>Saccharum officinarum</i>	55,4	69,9
NP_179836	<i>A. thaliana</i>	54,3	71,4
D84613	<i>A. thaliana</i>	54,5	71,2

Tabela 9

Comparação de PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14) com as proteínas de MADS-box conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q8LPA5	<i>P. patens</i>	63,0	63,0
Q6QAF0	<i>P. patens</i>	62,6	62,6
Q9FE71	<i>P. patens</i>	53,4	55,8
Q9FE89	<i>P. patens</i>	49,1	53,7
Q8LLC8	<i>Lycopodium annotinum</i>	46,1	59,5

10

Tabela 10:

Comparação de PpAK-1 (SEQ ID NO: 16) com as proteínas quinases de adenosina conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
ADK_PHYPA	<i>P. patens</i>	100	100
NP_195950	<i>A. thaliana</i>	66,3	77,8
XP_466836	<i>O. sativa</i>	68,2	77,6
Q84P58	<i>O. sativa</i>	62,9	71,5
NP_187593	<i>A. thaliana</i>	64,7	76,6

Tabela 11

Comparação de PpZF-6 (SEQ ID NO: 18) com proteínas de dedo de zinco conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
NP 180709	<i>A. thaliana</i>	61,1	71,0
XP 472997	<i>O. sativa</i>	63,4	72,1
NP 176722	<i>A. thaliana</i>	61,8	72,4
T02366	<i>A. thaliana</i>	54,7	64,1
NP 172080	<i>A. thaliana</i>	58,9	69,0

Tabela 12

5 Comparação de PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20) com as subunidades reguladoras de quinase dependentes de ciclina conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q6JJ57	<i>Ipomoea trifida</i>	76,9	83,5
Q6T300	<i>G. max</i>	79,1	82,4
NP 180364	<i>A. thaliana</i>	74,7	82,4
XP 470214	<i>O. sativa</i>	80,2	84,6
Q8GZU5	<i>Populus tremula x P. tremuloides</i>	75,8	80,2

Tabela 13

Comparação de PpZF-7 (SEQ ID NO: 22) com as proteínas de dedo de zinco RING conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q6F3A0	<i>O. sativa</i>	34,7	47,3
Q852N7	<i>O. sativa</i>	35,5	48,5
Q7XJB5	<i>O. sativa</i>	33,1	45,9
NP 851050	<i>A. thaliana</i>	35,3	46,2
NP 851051	<i>A. thaliana</i>	35,3	46,2

10

Tabela 14

Comparação de PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24) com a proteína 1 equivalente ao filamento de ligação de MAR conhecida

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
MFP1 TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i>	18,0	30,5
NP 914440	<i>O. sativa</i>	16,8	30,1
MFP1 ARATH	<i>A. thaliana</i>	19,2	30,3
NP 188221	<i>A. thaliana</i>	20,1	31,1
T07111	<i>Lycopersicon esculentum</i>	19,6	31,6

Tabela 15

Comparação de PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26) com as quinases de proteína equivalentes ao receptor de repetição rico em leucina conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q9XGG1	<i>Sorghum bicolor</i>	9,3	16,1
NP_189183	<i>A. thaliana</i>	9,2	14,6
Q708X5	<i>Cicer arietinum</i>	18,0	28,6
XP_474976	<i>O. sativa</i>	5,9	10,3
Q9LSU7	<i>A. thaliana</i>	9,2	14,0

Tabela 16

5 Comparação de PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28) com as quinases de proteína de sensor de luz conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
S27396	<i>Ceratodon purpureus</i>	5,7	11,4
P93098	<i>Ceratodon purpureus</i>	5,8	11,5
PHY1 CERPU	<i>Ceratodon purpureus</i>	5,7	11,4
NP_564829	<i>A. thaliana</i>	19,0	32,1
H96666	<i>A. thaliana</i>	19,5	31,6

Tabela 17

Comparação de PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30) com proteínas relacionadas com a Sinaptobrevina

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
NP_180871	<i>A. thaliana</i>	73,0	84,2
Q7X9C5	<i>Pyrus pyrifolia</i>	64,9	75,2
NP_180826	<i>A. thaliana</i>	55,4	63,8
Q681H0	<i>A. thaliana</i>	71,2	83,8

10

Tabela 18

Comparação de PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32) com proteínas de Calcineurina B conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
XP_313573	<i>Anopheles gambiae</i>	19,1	36,7
NP_505885	<i>Caenorhabditis elegans</i>	16,6	34,8
Q95P81	<i>Bombyx mori</i>	18,7	36,4
NP_524874	<i>D. melanogaster</i>	17,1	35,3

Tabela 19

Comparação de PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34) com proteínas relacionadas com caleosina conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q9SQ57	<i>Sesamum indicum</i>	64,9	78,4
T07092	<i>G. max</i>	67,5	74,6
NP_194404	<i>A. thaliana</i>	61,2	74,7
NP_200335	<i>A. thaliana</i>	62,1	72,8
XP_473140	<i>O. sativa</i>	60,2	73,0

Tabela 20

5 Comparação de PpHD-1 (SEQ ID NO: 36) com as proteínas da histona desacetilase conhecidas

Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
Q8W508	<i>Zea mays</i>	81,9	88,6
NP_190054	<i>A. thaliana</i>	78,7	88,2
T47443	<i>A. thaliana</i>	76,1	85,8
Q6JJ24	<i>Ipomoea trifida</i>	68,2	75,6
Q7XLX3	<i>Oryza sativa</i>	70,1	77,5

EXEMPLO 2 - Clonagem de cDNAs de tamanho natural a partir de outras plantas

Plantas de canola, soja, arroz, milho, linhaça e trigo foram cultivadas sob uma variedade de condições e tratamentos e tecidos diferentes foram colhidos em vários estágios de desenvolvimento. O crescimento de planta e a colheita foram feitos em uma maneira estratégica tal que a probabilidade de colher todos os genes expressáveis em pelo menos uma ou mais das bibliotecas resultantes fosse maximizada. O mRNA foi isolado de cada uma das amostras coletadas e as bibliotecas de cDNA foram construídas. Nenhuma etapa de amplificação foi usada no processo de produção da biblioteca de modo a minimizar a redundância de genes dentro da amostra e para reter a informação de expressão. Todas as bibliotecas foram 3' geradas a partir de mRNA purificado em colunas de oligo dT. As colônias da transformação da

biblioteca de cDNA em *E. coli* foram aleatoriamente escolhidas e colocadas em placas microtituladoras.

O DNA plasmídico foi isolado das colônias de *E. coli* e depois manchadas em membranas. Uma bateria de 288 oligonucleotídeos 7-mer radiorrotulados com  $^{33}\text{P}$  foram sequencialmente hibridizados a estas membranas. Para aumentar o rendimento, membranas em duplicata foram processadas. Depois de cada hibridização, uma imagem de mancha foi capturada durante uma varredura de fosforimagem para gerar um perfil de hibridização para cada oligonucleotídeo. Esta imagem de dados brutos foi automaticamente transferida a um computador. A identidade absoluta foi mantida pelo código de barras quanto o cassete de imagem, filtro e orientação dentro do cassete. Os filtros foram depois tratados usando condições relativamente brandas para despojar as sondas ligadas e retornados para as câmaras de hibridização para uma outra rodada de hibridização. O ciclo de hibridização e formação de imagem foi repetido até que o conjunto de 288 oligômeros foi completado.

Depois da conclusão das hibridizações, um perfil foi gerado para cada mancha (representando um inserto de cDNA), quanto a qual dos 288 oligonucleotídeos 7-mer radiorrotulado com  $^{33}\text{P}$  ligou a esta mancha particular (inserto de cDNA) e em qual grau. Este perfil é definido como a assinatura gerada deste clone. Cada assinatura do clone foi comparada com todas as outras assinaturas geradas do mesmo organismo para identificar grupos de assinaturas relacionadas. Este processo “classifica” todos os clones de um organismo em grupos antes de sequenciar.

Os clones foram classificados em vários grupos com base em ter assinaturas de hibridização idênticas ou similares. Um grupo deve ser indicativo da expressão de um gene individual ou família de gene. Um subproduto desta análise é um perfil de expressão para a abundância de cada gene em uma biblioteca particular. O sequenciamento de um caminho a

partir da extremidade 5' foi usada para prognosticar a função dos clones particulares pelas pesquisas de similaridade e motivo nas bases de dados de sequência.

A sequência de DNA de tamanho natural de *P. patens* PpHD-1 (SEQ ID NO: 35) foi submetido a blast contra bases de dados patenteadas de cDNAs de canola, soja, arroz, milho, linhaça e trigo em um valor  $e^{-10}$  (Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Todos os acertos contíguos foram analisados quanto às sequências de tamanho natural putativas e os clones mais longos representando os contíguos de tamanho natural putativo foram completamente sequenciados. Dois homólogos de canola (BnHD-1, SEQ ID NO: 38 e BnHD-2, SEQ ID NO: 40), um homólogo do milho (ZmHD-1, SEQ ID NO: 42), um homólogo da linhaça (LuHD-1, SEQ ID NO: 44), uma sequência do arroz (OsHD-1, SEQ ID NO: 46), três sequências da soja (GmHD-1, SEQ ID NO: 48, GmHD-2, SEQ ID NO: 50 e GmHD-3, SEQ ID NO: 52) e uma sequência do trigo (TaHD-1, SEQ ID NO: 54) foram identificados. O grau de identidade de aminoácido e similaridade destas sequências com a sequência pública mais próxima conhecida são indicados na Tabela 21 (A Comparação aos Pares foi usada: penalidade de intervalo: 10; penalidade de extensão de intervalo: 0,1; matriz de contagem: blosum62).

Tabela 21

## Grau de Identidade e Similaridade de Aminoácido das Histona Desacetilases

Nome do Gene (SEQ ID NO)	Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
BnHD-1 (SEQ ID NO: 38)	NP_190054	<i>A. thaliana</i>	96 %	98,1 %
BnHD-2 (SEQ ID NO: 40)	NP_201116	<i>A. thaliana</i>	92,6 %	95,3 %
ZmHD-1 (SEQ ID NO: 42)	NP_563817	<i>A. thaliana</i>	66,4 %	77,2 %
LuHD-1 (SEQ ID NO: 44)	NP_190054	<i>A. thaliana</i>	87,4 %	94,4 %
OsHD-1 (SEQ ID NO: 46)	Q7Y0Y8	<i>O. sativa</i>	100 %	100 %

Nome do Gene (SEQ ID NO)	Base de Dados Pública Acesso #	Espécie	Identidade de Sequência (%)	Similaridade de Sequência (%)
GmHD-1 (SEQ ID NO: 48)	NP_563817	<i>A. thaliana</i>	63,1 %	74 %
GmHD-2 (SEQ ID NO: 50)	NP_190054	<i>A. thaliana</i>	85,6 %	92,1 %
GmHD-2 (SEQ ID NO: 52)	NP_567921	<i>A. thaliana</i>	67,2 %	77,4 %
TaHD-1 (SEQ ID NO: 54)	Q7Y0Y8	<i>O. sativa</i>	89,4 %	93,8 %

### EXEMPLO 3 - Plantas de *Arabidopsis* tolerantes ao estresse

Um fragmento contendo o polinucleotídeo *P. patens* foi ligado em um vetor binário contendo um gene marcador selecionável. O vetor recombinante resultante conteve o polinucleotídeo correspondente listado na Tabela 1 na orientação de sentido sob o super promotor constitutivo. Os vetores recombinantes foram transformados em plantas *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 e PMP90 de acordo com as condições padrão. As plantas de *A. thaliana* ecotipo C24 foram cultivadas e transformadas de acordo com as condições padrão. As plantas T1 foram triadas quanto a resistência ao agente de seleção conferido pelo gene marcador selecionável e sementes T1 foram coletadas.

Os polinucleotídeos de *P. patens* foram super expressados em *A. thaliana* sob o controle de um promotor constitutivo. sementes T2 e/ou T3 foram triadas quanto a resistência ao agente de seleção conferido pelo gene marcador selecionável nas placas e as plantas positivas foram transplantadas no solo e cultivadas em uma câmara de crescimento por 3 semanas. A umidade do solo foi mantida por todo este tempo em aproximadamente 50 % da capacidade máxima de contenção de água do solo.

A perda de água total (transpiração) pela planta durante este tempo foi medida. Depois de 3 semanas, o material vegetal inteiro acima do solo foi coletado, secado a 65° C por 2 dias e pesado. A razão de peso seco da planta acima do solo (DW) para o uso de água pela planta é a eficiência no uso da água (WUE). As Tabelas 22 a 41 apresentam WUE e DW para eventos

de transformação independentes (linhagens) de plantas transgênicas que super expressam os polinucleotídeos de *P. patens*. As médias dos quadrados mínimos (LSM), erros padrão e valor significativo (P) de uma linhagem comparada com os controles do tipo selvagem de uma Análise de Variação são apresentados. A melhora percentual de cada linhagem de polinucleotídeo de *P. patens* quando comparada com as plantas de controle do tipo selvagem para WUE e DW também é apresentada.

Tabela 22

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,136	0,011	—	—
	PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2)	8	0,217	0,025	60	0,0033
		6	0,222	0,028	64	0,0047
		5	0,226	0,032	67	0,0085
		10	0,228	0,025	68	0,0009
WUE	tipo selvagem		2,270	0,085	—	—
	PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2)	8	2,274	0,190	0	0,9822
		6	2,308	0,212	2	0,8656
		2	2,426	0,245	7	0,5465
		5	2,675	0,245	18	0,1207

10

Tabela 23

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,088	0,009	—	—
	PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4)	4	0,117	0,016	33	0,1147
		1	0,125	0,016	42	0,0473
WUE	tipo selvagem		1,446	0,097	—	—
	PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4)	4	1,890	0,186	31	0,036
		1	1,947	0,186	35	0,0183

Tabela 24

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,109	0,033	—	—
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6)	10	0,161	0,034	48	0,2835
WUE	tipo selvagem		1,782	0,119	—	—
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6)	10	2,205	0,169	24	0,0529

Tabela 25

Linhasgens de *A. thaliana* que super expressam PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8)

Medição	Genótipo	Linagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,088	0,008	—	—
	PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8)	2	0,130	0,017	48	0,0276
WUE	tipo selvagem		1,446	0,102	—	—
	PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8)	2	2,301	0,214	59	0,0004

Tabela 26

Linhasgens de *A. thaliana* que super expressam PpPD-1 (SEQ ID NO: 10)

Medição	Genótipo	Linagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,114	0,006	—	—
	PpPD-1 (SEQ ID NO: 10)	3	0,171	0,019	50	0,0045
		1	0,171	0,017	50	0,0019
		8	0,174	0,019	53	0,0026
		2	0,182	0,019	60	0,0007
		11	0,191	0,017	67	<,0001
		5	0,201	0,019	76	<,0001
		9	0,204	0,017	79	<,0001
WUE	tipo selvagem		1,958	0,058	—	—
	PpPD-1 (SEQ ID NO: 10)	11	2,328	0,165	19	0,0353
		1	2,343	0,165	20	0,0286
		8	2,354	0,180	20	0,0383
		2	2,450	0,180	25	0,0102
		3	2,517	0,180	29	0,0036
		5	2,552	0,180	30	0,002
		9	2,572	0,165	31	0,0006

5

Tabela 27

Linhasgens de *A. thaliana* que super expressam PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12)

Medição	Genótipo	Linagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,136	0,011	—	—
	PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12)	3	0,227	0,027	68	0,0026
		2	0,240	0,025	77	0,0002
		1	0,247	0,025	82	<,0001
		4	0,271	0,022	100	<,0001
WUE	tipo selvagem		2,270	0,085	—	—
	PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12)	2	2,343	0,191	3	0,7268
		4	2,631	0,174	16	0,0654
		1	2,820	0,191	24	0,0097

Tabela 28

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,110	0,005	–	–
	PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14)	1	0,154	0,017	39	0,0146
WUE	tipo selvagem		1,620	0,066	–	–
	PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14)	1	2,144	0,209	32	0,0182

Tabela 29

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpAK-1 (SEQ ID NO: 16)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,136	0,011	–	–
	PpAK-1 (SEQ ID NO: 16)	1	0,185	0,022	36	0,049
		5	0,216	0,022	59	0,0014
		3	0,217	0,027	60	0,0063
		7	0,217	0,024	60	0,0026
		8	0,227	0,024	68	0,0008
		4	0,230	0,024	69	0,0006
WUE	tipo selvagem		2,270	0,084	–	–
	PpAK-1 (SEQ ID NO: 16)	8	2,285	0,188	1	0,9394
		7	2,358	0,188	4	0,6683
		5	2,374	0,172	5	0,5851
		3	2,377	0,211	5	0,6369
		4	2,403	0,188	6	0,5191

5

Tabela 30

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpZF-6 (SEQ ID NO: 18)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,107	0,015	–	–
	PpZF-6 (SEQ ID NO: 18)	4	0,131	0,018	22	0,3091
WUE	tipo selvagem		1,897	0,316	–	–
	PpZF-6 (SEQ ID NO: 18)	4	2,026	0,371	7	0,7946

Tabela 31

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,088	0,009	–	–
	PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20)	7	0,148	0,017	69	0,0029
WUE	tipo selvagem		1,446	0,102	–	–
	PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20)	7	1,963	0,195	36	0,0207

Tabela 32

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpZF-7 (SEQ ID NO: 22)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,114	0,006	–	–
	PpZF-7 (SEQ ID NO: 22)	1	0,151	0,019	32	0,0617
		10	0,153	0,019	35	0,0456
		2	0,159	0,019	39	0,0226
		7	0,160	0,019	40	0,0198
		3	0,163	0,019	43	0,0139
		6	0,175	0,019	54	0,0021
		9	0,176	0,019	55	0,0018
		5	0,177	0,019	56	0,0014
		8	0,196	0,019	72	<,0001
4	0,217	0,019	90	<,0001		
WUE	tipo selvagem		1,958	0,057	–	–
	PpZF-7 (SEQ ID NO: 22)	2	2,185	0,176	12	0,2224
		10	2,237	0,176	14	0,1331
		7	2,242	0,176	15	0,1262
		9	2,327	0,176	19	0,0479
		3	2,359	0,176	20	0,0318
		6	2,378	0,176	21	0,0245
		1	2,435	0,176	24	0,0108
		5	2,490	0,176	27	0,0045
		8	2,537	0,176	30	0,002
4	2,707	0,176	38	<,0001		

Tabela 33

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,110	0,005	–	–
	PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24)	4	0,128	0,016	16	0,3008
		2	0,130	0,016	18	0,25
		10	0,145	0,016	31	0,0465
		3	0,146	0,016	32	0,0417
		6	0,159	0,016	44	0,0048
		7	0,164	0,016	48	0,0022
		5	0,166	0,016	50	0,0015
		1	0,168	0,016	52	0,0011
		8	0,172	0,016	56	0,0004
WUE	tipo selvagem		1,620	0,064	–	–
	PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24)	3	1,979	0,203	22	0,0929
		8	2,049	0,203	26	0,0451
		7	2,049	0,203	26	0,0449
		4	2,095	0,203	29	0,0267
		1	2,113	0,203	30	0,0215
		6	2,178	0,203	34	0,0094
		5	2,217	0,203	37	0,0055
		10	2,324	0,203	43	0,0011
		2	2,345	0,203	45	0,0008

Tabela 34

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,136	0,011	–	–
	PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26)	4	0,199	0,029	47	0,042
		2	0,206	0,023	52	0,0078
		3	0,224	0,029	65	0,0049
		1	0,227	0,023	67	0,0007
		5	0,235	0,026	74	0,0006
		8	0,266	0,040	96	0,0026
WUE	tipo selvagem		2,270	0,090	–	–
	PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26)	4	2,360	0,224	4	0,7073
		5	2,402	0,200	6	0,5481
		1	2,404	0,183	6	0,5095
		8	2,471	0,317	9	0,5426

Tabela 35

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,108	0,007	–	–
	PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28)	4	0,157	0,020	45	0,023
		2	0,159	0,018	47	0,0097
		10	0,175	0,020	62	0,0018
		9	0,177	0,022	64	0,0037
WUE	tipo selvagem		1,951	0,078	–	–
	PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28)	4	2,043	0,219	5	0,6913
		9	2,158	0,245	11	0,4225
		2	2,177	0,200	12	0,2948
		10	2,523	0,219	29	0,0149

5

Tabela 36

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,114	0,006	–	–
	PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30)	7	0,152	0,018	33	0,0495
		6	0,159	0,018	39	0,0196
		1	0,162	0,020	42	0,026
		10	0,164	0,017	44	0,0054
		9	0,167	0,015	46	0,0015
		8	0,174	0,018	53	0,0019
		2	0,179	0,018	57	0,0008
		WUE	tipo selvagem		1,958	0,057
PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30)	10		2,109	0,161	8	0,3776
	8		2,197	0,177	12	0,1991
	9		2,239	0,149	14	0,0802
	2		2,302	0,177	18	0,0659
	6		2,405	0,177	23	0,017
	1		2,450	0,197	25	0,0178

Tabela 37

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,114	0,006	–	–
	PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32)	5	0,156	0,019	37	0,034
		8	0,163	0,019	43	0,0153
		4	0,179	0,019	57	0,0012
		3	0,180	0,019	58	0,0011
		6	0,181	0,017	59	0,0003
		1	0,182	0,017	59	0,0003
		9	0,214	0,017	87	<,0001
WUE	tipo selvagem		1,958	0,057	–	–
	PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32)	3	2,109	0,177	8	0,4181
		5	2,152	0,177	10	0,2991
		8	2,158	0,177	10	0,2836
		1	2,298	0,162	17	0,0489
		6	2,306	0,162	18	0,0438
		9	2,319	0,162	18	0,0367
		4	2,440	0,177	25	0,0105

Tabela 38

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,114	0,006	–	–
	PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34)	9	0,156	0,017	37	0,0226
		10	0,170	0,017	49	0,0027
		1	0,179	0,017	57	0,0005
		4	0,188	0,017	65	<,0001
		7	0,188	0,017	65	<,0001
		3	0,192	0,017	68	<,0001
		8	0,194	0,017	70	<,0001
		2	0,203	0,017	78	<,0001
WUE	tipo selvagem		1,958	0,054	–	–
	PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34)	9	1,944	0,168	-1	0,9357
		2	2,314	0,168	18	0,0451
		10	2,322	0,168	19	0,0405
		8	2,448	0,168	25	0,0061
		3	2,545	0,168	30	0,0011
		4	2,569	0,168	31	0,0007
		1	2,617	0,168	34	0,0003
		7	2,771	0,168	42	<,0001

5

Tabela 39

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpHD-1 (SEQ ID NO: 36)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		1,620	0,065	–	–
	PpHD-1 (SEQ ID NO: 36)	7	1,976	0,207	22	0,1027
		3	1,985	0,207	23	0,0944

		6	2,144	0,207	32	0,0169
		2	2,374	0,207	47	0,0007
		8	2,444	0,207	51	0,0002
WUE	tipo selvagem		0,110	0,005	–	–
	PpHD-1 (SEQ ID NO: 36)	2	0,126	0,016	14	0,3655
		8	0,143	0,016	30	0,0566
		6	0,149	0,016	35	0,0246
		3	0,152	0,016	37	0,0177
		7	0,191	0,016	73	<,0001

Tabela 40

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpLRP-1 (SEQ ID NO: 56)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	tipo selvagem		0,109	0,033	–	–
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 56)	10	0,161	0,034	48	0,2835
WUE	tipo selvagem		1,782	0,119	–	–
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 56)	10	2,205	0,169	24	0,0529

Tabela 41

Linhagens de *A. thaliana* que super expressam PpLRP-1 (SEQ ID NO: 58)

Medição	Genótipo	Linhagem	LSM	Erro Padrão	% de Melhora	P
DW	Tipo selvagem		0,109	0,033	–	–
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 58)	10	0,161	0,034	48	0,2835
WUE	Tipo selvagem		1,782	0,119	–	–
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 58)	10	2,205	0,169	24	0,0529

## 5 EXEMPLO 4 - Plantas de Colza/Canola Tolerantes ao Estresse

Pecíolos cotiledonários de Canola de mudas jovens de 4 dias de idade são usados como explantes para a cultura de tecido e transformados de acordo com a EP1566443. O cultivar comercial Westar (Agriculture Canada) é a variedade padrão usada para a transformação, mas outras variedades podem ser usadas. *A. tumefaciens* GV3101:pMP90RK contendo um vetor binário é usada para a transformação de canola. O vetor binário padrão usado para a transformação é pSUN (WO 02/00900), mas sistemas de vetor binário muito diferentes foram descritos para a transformação de planta (por exemplo, Na, G. em *Agrobacterium* Protocols, Methods in Molecular Biology vol 44, pp 47-62, Gartland KMA e MR Davey eds. Humana Press, 10 Totowa, New Jersey). Um cassete de expressão de gene vegetal que 15

compreende um gene marcador de seleção e um promotor vegetal que regula a transcrição do cDNA que codifica o polinucleotídeo é utilizado. Vários genes marcadores de seleção podem ser usados incluindo o gene da ácido acetohidróxi sintase (AHAS) mutado divulgado nas Pat. US N<sup>os</sup> 5.767.366 e 6.225.105. Um promotor adequado é usado para regular o gene traço para fornecer a regulagem constitutiva, de desenvolvimento, tecido ou ambiental de transcrição do gene.

As sementes de canola são esterilizadas na superfície em 70 % de etanol por 2 min, incubadas por 15 min em água de torneira quente a 55° C e depois em hipoclorito de sódio a 1,5 % por 10 minutos, seguido por três enxágues com água destilada esterilizada. As sementes são depois colocadas em meio MS sem hormônios, contendo vitaminas B5 Gamborg, 3 % de sacarose e 0,8 % de Oxoidagar. As sementes são germinadas a 24° C por 4 dias em luz baixa ( $< 50 \mu\text{Mol/m}^2\text{s}$ , 16 horas de luz). Os explantes do pecíolo cotiledonário com o cotilédone ligado são excisado das mudas *in vitro* e inoculados com *Agrobacterium* pela imersão da extremidade do corte do explante de pecíolo na suspensão bacteriana. Os explantes são depois cultivados por 3 dias em meio MS incluindo vitaminas contendo 3,75 mg/l de BAP, 3 % de sacarose, 0,5 g/l de MES, pH 5,2, 0,5 mg/l GA3, 0,8 % de Oxoidagar a 24° C, 16 horas de luz. Depois de três dias de co-cultivo com *Agrobacterium*, os explantes de pecíolo são transferidos para o meio de regeneração contendo 3,75 mg/l de BAP, 0,5 mg/l de GA3, 0,5 g/l de MES, pH 5,2, 300 mg/l de timentina e agente de seleção até a regeneração de broto. Tão logo os explantes comecem a desenvolver brotos, eles são transferidos para o meio de alongamento de broto (A6, contendo o meio MS na concentração total incluindo vitaminas, 2 % de sacarose, 0,5 % de Oxoidagar, 100 mg/l de mio-inositol, 40 mg/l de sulfato de adenina, 0,5 g/l de MES, pH 5,8, 0,0025 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de IBA, 300 mg/l de timentina e agente de seleção).

As amostras tanto do material *in vitro* quando da estufa das plantas transgênicas primárias (T0) são analisadas pela qPCR usando sondas TaqMan para confirmar a presença de T-DNA e para determinar o número de integrações de T-DNA.

5 A semente é produzida a partir das plantas transgênicas primárias pela auto-polinização. As plantas da segunda geração são cultivadas em condições de estufa e auto-polinizadas. As plantas são analisadas pela qPCR usando sondas TaqMan para confirmar a presença de T-DNA e para determinar o número de integrações de T-DNA. As plantas homozigotas  
10 transgênicas, heterozigotas transgênicas e azigotas (transgênico nulo) são comparadas quanto a sua tolerância ao estresse, por exemplo, nos ensaios descritos no Exemplo 3 e quanto ao rendimento, tanto nos estudos em estufa quanto no campo.

EXEMPLO 5 - Triagem quanto a plantas de arroz tolerantes ao  
15 estresse

Plantas de arroz transgênicas que compreendem um polinucleotídeo da invenção são geradas usando métodos conhecidos. Aproximadamente 15 a 20 transformantes independentes (T0) são gerados. Os transformantes primários são transferidos das câmaras de cultura de tecido  
20 para uma estufa para crescimento e colheita das sementes T1. Cinco eventos da progênie T1 segregaram 3:1 quanto a presença/ausência do transgene são retidos. Para cada um destes eventos, 10 mudas T1 contendo o transgene (hetero- e homozigotas) e 10 mudas T1 carecendo do transgene (nulizigotas) são selecionados pela triagem de marcador visual. As plantas T1 selecionadas  
25 são transferidas a uma estufa. Cada planta recebe um único rótulo de código de barras para ligar de modo sem ambiguidade os dados da fenotipagem com a planta correspondente. As plantas T1 selecionadas são cultivadas no solo em vasos de 10 cm de diâmetro sob os seguintes ajustes ambientais: fotoperíodo = 11,5 h, intensidade da luz do dia = 30.000 lux ou mais, temperatura diurna

= 28° C ou mais alta, temperatura noturna = 22° C, umidade relativa = 60 a 70 %. As plantas transgênicas e os nulizigotos correspondentes são cultivados lado a lado em posições aleatórias. A partir do estágio de semeadura até o estágio de maturidade, as plantas são passadas diversas vezes através de uma  
5 cabina de formação de imagem digital. Em cada ponto de tempo imagens digitais (2048 x 1536 pixéis, 16 milhões de cores) de cada planta são tiradas de pelo menos 6 ângulos diferentes.

Os dados obtidos no primeiro experimento com plantas T1 são confirmados em um segundo experimento com plantas T2. As linhagens que  
10 têm o padrão de expressão correta são selecionados para outra análise. Os lotes de semente das plantas positivas (tanto hetero- quanto homozigotas) em T1 são triadas pela monitoração da expressão do marcador. Para cada evento escolhido, os lotes de semente heterozigota são depois retidos para a avaliação T2. Dentro de cada lote de semente, um número igual de plantas positivas e  
15 negativas são cultivadas na estufa para avaliação.

As plantas transgênicas são triadas quanto ao seu crescimento e/ou rendimento e/ou tolerância ao estresse melhorados, por exemplo, usando os ensaios descritos no Exemplo 3 e quanto ao rendimento, tanto em estudos na estufa quanto no campo.

#### 20 EXEMPLO 6 - Plantas de soja tolerantes ao estresse

Os polinucleotídeos das Tabelas 1 e 2 são transformados em soja usando os métodos descritos no pedido internacional copendente de propriedade em comum número WO 2005/121345, os conteúdos do qual são aqui incorporados por referência. As plantas transgênicas são depois triadas  
25 quanto ao seu crescimento melhorado sob condições limitadas em água e/ou tolerância à seca, sal e/ou frio, por exemplo, usando os ensaios descritos no Exemplo 3 e quanto ao rendimento, tanto em estudos na estufa quanto no campo.

#### EXEMPLO 7 - Plantas de trigo tolerantes ao estresse

A transformação de trigo é realizada com o método descrito por Ishida *et al.*, 1996, Nature Biotech. 14745-50. Embriões imaturos são co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* que carrega vetores “super binários” e plantas transgênicas são recuperadas através da organogênese. Este procedimento fornece uma eficiência de transformação entre 2,5 % e 20 %. As plantas transgênicas são depois triadas quanto ao seu crescimento e/ou rendimento melhorados sob condições limitadas em água e/ou tolerância ao estresse, por exemplo, é o ensaio descrito no Exemplo 3 e quanto ao rendimento, tanto em estudos na estufa quanto no campo.

#### 10 EXEMPLO 8 - Plantas de milho tolerantes ao estresse

As células de *Agrobacterium* que abrigam os genes e o gene *ahs* do milho no mesmo plasmídeo são cultivadas em meio YP suplementado com antibióticos apropriados por 1 a 3 dias. Uma alça de células de *Agrobacterium* é coletada e recolocada em suspensão em 1,5 ml de meio M-LS-002 (LS-inf) e o tubo contendo células de *Agrobacterium* é mantida em um agitador por 1 a 4 horas a 1.000 rpm.

Espigas de milho [genótipo J553x(HIIIAXA188)] são colhidas em 7 a 12 dias depois da polinização. As espigas são esterilizadas em solução a 20 % de Clorox por 15 minutos seguido por enxágue cuidadoso com água estéril. Os embriões imaturos com tamanho de 0,8 a 2,0 mm são dissecados no tubo contendo células de *Agrobacterium* em solução LS-inf.

A agro-infecção é realizada mantendo-se o tubo horizontalmente na capela laminar na temperatura ambiente por 30 minutos. A mistura da agro infecção é vertida em uma placa contendo o meio de co-cultivo (M-LS-011). Depois a agro-solução líquida é pipetada, os embriões transferidos para a superfície de um papel de filtro que é colocado no meio de co-cultivo de ágar. A solução bacteriana em excesso é removida com uma pipeta. Os embriões são colocados sobre o meio de co-cultivo com escutelo para cima e cultivados no escuro a 22° C por 2 a 4 dias.

Os embriões são transferidos para o meio de M-MS-101 sem seleção. Sete a dez dias mais tarde, os embriões são transferidos para meio M-LS-401 contendo 0,50  $\mu\text{M}$  de imazethapyr e cultivados por 4 semanas (duas transferências de 2 semanas) para selecionar quanto as células de calo transformada. A regeneração da planta é iniciada pela transferência de calos resistentes ao meio de M-LS-504 suplementado com 0,75  $\mu\text{M}$  de imazethapyr e cultivados sob luz de 25 a 27° C por duas a três semanas. Os brotos regenerados são depois transferidos para a caixa de enraizamento com meio M-MS-618 (0,5  $\mu\text{M}$  de imazethapyr). As plantinhas com raízes são transferidas para mistura de vaso em vasos pequenos na estufa e depois da aclimatização são então transplantadas para vasos maiores e mantidas na estufa até a maturidade.

O número de cópia do transgene em cada plantinha é ensaiado usando a análise de Taqman de DNA genômico e a expressão de transgene é ensaiada usando qRT-PCR de RNA total isolado das amostras de folha.

Usando ensaios tais como o ensaio descrito no Exemplo 3, cada uma destas plantas é rotulada de modo único, amostrada e analisada quanto ao número de cópias do transgene. As plantas positivas e negativas em transgene são marcadas e emparelhadas com tamanhos similares para transplantar junto para vasos maiores. Isto fornece um ambiente uniforme e competitivo para as plantas positivas e negativas em transgene. Os vasos grandes são regados a uma certa porcentagem da capacidade de água no campo do solo dependendo da severidade de estresse pela água desejado. O nível de água no solo é mantido regando-se todos os dias. O crescimento da planta e os traços fisiológicos tais como altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, emurchecimento da planta, taxa de extensão da folha, situação de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese são medidos durante o período de crescimento. Depois de um período de crescimento, a porção acima do solo das plantas é colhida e o peso fresco e peso seco de cada

planta são tirados. Uma comparação do fenótipo de tolerância à seca entre as plantas positivas e negativas em transgene é então feita.

5 Usando ensaios tais como o ensaio descrito no Exemplo 3, os vasos são cobertos com tampas que permitem que as mudas cresçam através dela mas minimizem a perda de água. Cada vaso é pesado periodicamente e água adicionada para manter o teor de água inicial. No final do experimento, o peso fresco e seco de cada planta é medido, a água consumida por cada planta é calculada e a WUE de cada planta é computada. O crescimento da planta e os traços fisiológicos tais como WUE, altura, diâmetro do caule, 10 enrolamento da folha, emurchecimento da planta, taxa de extensão da folha, situação de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese são medidos durante o experimento. Uma comparação do fenótipo WUE entre as plantas positivas e negativas em transgene é depois feita.

15 Usando ensaios tais como o ensaio descrito no Exemplo 3, estes vasos são mantidos em uma área na estufa que tem condições ambientais uniformes e cultivadas otimamente. Cada uma destas plantas é unicamente rotulada, amostrada e analisada quanto ao número de cópia de transgene. As plantas são deixadas crescer sob estas condições até que elas atinjam um estágio de crescimento pré definido. A água é depois negada. O crescimento 20 de planta e os traços fisiológicos tais como altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, emurchecimento da planta, taxa de extensão da folha, situação de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese são medidos como aumentos na intensidade de estresse. Uma comparação do fenótipo de tolerância à dessecação entre plantas positivas e negativas em transgene é 25 depois feita.

Sementes de milho transgênico segregantes quanto a um evento de transformação são plantadas em vasos pequenos para testar em um ensaio de seca cíclica. Estes vasos são mantidos em uma área na estufa que tivesse condições ambientais uniformes e cultivadas otimamente. Cada uma

destas plantas é unicamente rotulada, amostrada e analisada quanto ao número de cópia de transgene. As plantas são deixadas crescer sob estas condições até que elas atingissem um estágio de crescimento pré definido. As plantas são depois repetidamente regadas até a saturação em um intervalo fixo de tempo.

5 Este ciclo de água/seca é repetido pela duração do experimento. O crescimento de planta e os traços fisiológicos tais como altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, emurchecimento da planta, taxa de extensão da folha, situação de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese são medidos durante o período de crescimento. No final do experimento, as  
10 plantas são colhidas para peso fresco e seco acima do solo. Uma comparação do fenótipo de tolerância à seca cíclica entre plantas positivas e negativas em transgene é depois feita.

De modo a testar o milho transgênico segregante quanto a tolerância à seca sob condições isentas de chuva, o estresse à seca controlado  
15 em uma única localização ou localizações múltiplas é usado. A disponibilidade de água da safra é controlada pela irrigação por gotejamento ou suspensa em uma localização que tem menos do que 10 cm de chuva e temperaturas mínimas maiores de 5° C esperados durante uma estação média de 5 meses ou uma localização com precipitação na estação esperada  
20 interceptada por uma cobertura contra chuva automatizada que retrai para fornecer condições de campo aberto quando não requerido. As práticas agronômicas padrão na área são seguidas quanto a preparação do solo, plantio, fertilização e controle de praga. Cada vaso é semeado com semente segregante quanto a presença de um único evento de inserção transgênica. Um  
25 ensaio do número de cópias de transgene Taqman é usado em amostras de folha para diferenciar os transgênicos de plantas de controle nulas em segregantes. As plantas que foram genotipadas desta maneira também são contadas quanto a uma faixa de fenótipos relacionados com a tolerância à seca, crescimento e rendimento. Estes fenótipos incluem a altura da planta,

peso do grão por planta, número de grão por planta, número de espigas por planta, peso seco acima do solo, condutância da folha para vapor d'água, captação de CO<sub>2</sub> pela folha, teor de clorofila da folha, parâmetros de fluorescência da clorofila relacionada com a fotossíntese, eficiência no uso da água, potencial de água na folha, teor de água relativa da folha, taxa de fluxo da seiva do caule, condutividade hidráulica do caule, temperatura da folha, reflectância da folha, absorptância de luz da folha, área da folha, dias para florescer, intervalo de formação de seda da antese, duração do enchimento de grão, potencial osmótico, ajuste osmótico, tamanho da raiz, taxa de extensão da folha, ângulo da folha, enrolamento e sobrevivência da folha. Todas as medições são feitas com instrumentação comercialmente disponível para a fisiologia de campo, usando os protocolos padrão fornecidos pelos fabricantes. As plantas individuais são usadas como a unidade de réplica por evento.

De modo a testar o milho transgênico não segregante quanto a tolerância à seca sob condições isentas de chuva, o estresse pela seca controlada em uma única localização ou localizações múltiplas é usado. A disponibilidade de água da safra é controlada pela irrigação por gotejamento ou suspensa em uma localização que tem menos do que 10 cm de chuva e temperaturas mínimas maiores de 5° C esperados durante uma estação média de 5 meses ou uma localização com precipitação na estação esperada interceptada por uma “cobertura contra chuva” automatizada que retrai para fornecer condições de campo aberto quando não requerido. As práticas agronômicas padrão na área são seguidas quanto a preparação do solo, plantio, fertilização e controle de praga. O esquema de teste é designado para emparelhar uma plotagem contendo um evento transgênico não segregante com uma plotagem adjacente de controles de segregante nulo. Um segregante nulo é a progênie (ou linhagens derivadas da progênie) de uma planta transgênica que não contém o transgene devido à segregação Mendeliana. As

plotagens aos pares de réplicas adicionais para um evento particular são distribuídas em torno do teste. Uma faixa de fenótipos relacionados com a tolerância à seca, crescimento e rendimento é contada nas plotagens emparelhadas e estimadas ao nível da plotagem. Quando a técnica de medição apenas pôde ser aplicada às plantas individuais, estas são selecionadas ao acaso de cada vez de dentro da plotagem. Estes fenótipos incluem altura da planta, peso do grão por planta, número de grão por planta, número de espigas por planta, peso seco acima do solo, condutância da folha para vapor d'água, captação de CO<sub>2</sub> pela folha, teor de clorofila da folha, parâmetros de fluorescência da clorofila relacionada com a fotossíntese, eficiência no uso da água, potencial de água na folha, teor de água relativa da folha, taxa de fluxo da seiva do caule, condutividade hidráulica do caule, temperatura da folha, reflectância da folha, absorptância de luz da folha, área da folha, dias para florescer, intervalo de formação de seda da antese, duração do enchimento de grão, potencial osmótico, ajuste osmótico, tamanho da raiz, taxa de extensão da folha, ângulo da folha, enrolamento e sobrevivência da folha. Todas as medições são feitas com instrumentação comercialmente disponível para a fisiologia de campo, usando os protocolos padrão fornecidos pelos fabricantes. As plotagens individuais são usadas como a unidade de réplica por evento.

Para realizar o teste em localização múltipla de milho transgênico quanto a tolerância à seca e rendimento, de cinco a vinte localizações abrangendo as regiões de maior cultivo de milho são selecionadas. Estas são amplamente distribuídas para fornecer uma faixa de disponibilidades de água de safra esperadas com base na temperatura, umidade, precipitação e tipo de solo médios. A disponibilidade de água de safra não é modificada além das práticas agronômicas padrão. O esquema de teste é planejado para emparelhar uma plotagem contendo um evento transgênico não segregante com uma plotagem adjacente de controles de

segregante nulo. Uma faixa de fenótipos relacionados com a tolerância à seca, crescimento e rendimento é contada nas plotagens emparelhadas e estimadas ao nível da plotagem. Quando a técnica de medição seria apenas aplicada às plantas individuais, estas são selecionadas ao acaso de cada vez de dentro da

5 plotagem. Estes fenótipos incluem altura da planta, peso do grão por planta, número de grão por planta, número de espigas por planta, peso seco acima do solo, condutância da folha para vapor d'água, captação de CO<sub>2</sub> pela folha, teor de clorofila da folha, parâmetros de fluorescência da clorofila relacionada com a fotossíntese, eficiência no uso da água, potencial de água na folha, teor

10 de água relativa da folha, taxa de fluxo da seiva do caule, condutividade hidráulica do caule, temperatura da folha, reflectância da folha, absorptância de luz da folha, área da folha, dias para florescer, intervalo de formação de seda da antese, duração do enchimento de grão, potencial osmótico, ajuste osmótico, tamanho da raiz, taxa de extensão da folha, ângulo da folha,

15 enrolamento e sobrevivência da folha. Todas as medições são feitas com instrumentação comercialmente disponível para a fisiologia de campo, usando os protocolos padrão fornecidos pelos fabricantes. As plotagens individuais são usadas como a unidade de réplica por evento.

## REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma tRNA 2'-fosfotransferase.
2. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma quinase de proteína CDC2.
- 10 3. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de repetição rica em leucina.
- 15 4. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína que liga Ran.
- 20 5. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de divisão de plastídeo.
- 25 6. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína carreadora do substrato mitocondrial.
7. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de MADS-box.

8. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína da adenosina quinase-1.

5 9. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de dedo de zinco 6.

10 10. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de subunidade reguladora da quinase dependente de ciclina.

15 11. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de dedo de zinco 7.

20 12. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína de ligação de MAR.

13. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína LRP-2.

25 14. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da quinase de proteína fitocrômica.

15. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica,

caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sinaptobrevina.

5 16. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína B de calcineurina.

10 17. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de caleosina.

15 18. Célula de planta transgênica ou uma planta transgênica, caracterizadas pelo fato de que são transformadas com um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína da histona desacetilase.

19. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste de

(a) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de polinucleotídeo apresentada na Tabela 1 ou Tabela 2;

20 (b) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 50 % de identidade com a sequência de aminoácido do polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de (a); e

25 (c) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza com uma molécula de ácido nucleico de (a) a (b) sob condições de hibridização estridentes.

20. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste de

(a) uma sequência de polipeptídeo apresentada na Tabela 1; e

(b) um polipeptídeo que tem pelo menos 50 % de identidade com a sequência de polipeptídeo de (a).

21. Método de produzir uma planta transgênica, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um polinucleotídeo como definido na reivindicação 19, em que a expressão do polinucleotídeo na planta resulta no crescimento e/ou rendimento aumentado da planta sob condições normais ou limitadas em água e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da planta que compreende as etapas de:

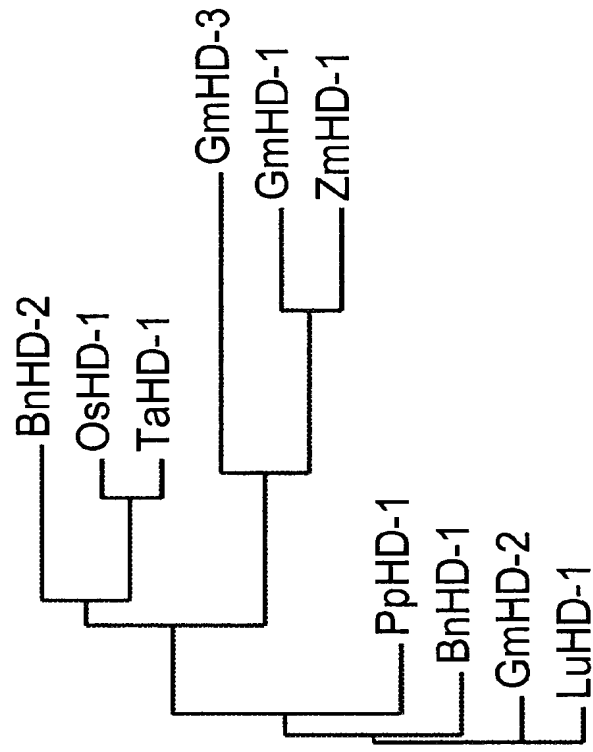
(a) introduzir em uma célula vegetal um vetor de expressão que compreenda pelo menos um polinucleotídeo como definido na reivindicação 19 e

(b) gerar a partir da célula vegetal uma planta transgênica que expresse o polinucleotídeo,

em que a expressão do polinucleotídeo na planta transgênica resulta no crescimento e/ou rendimento aumentados da planta sob condições normais ou limitadas em água e/ou tolerância aumentada ao estresse ambiental quando comparada com uma variedade do tipo selvagem da planta.

22. Método de aumentar um crescimento e/ou rendimento da planta sob condições normais ou limitadas em água e/ou aumentar uma tolerância da planta a um estresse ambiental, o método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de aumentar a expressão de pelo menos um polinucleotídeo como definido na reivindicação 19 na planta.

FIGURA 1



## FIGURA 2A

BN50000854 (1) -----METDESG---VSLASGPDGRKRRVSYFYEPTI  
 BN51361834 (1) -----MRSKDKISYFYDGDV  
     EST468 (1) -----MPVKDRISYFYDGDV  
 GM49753757 (1) -----MRSKDRIAYFYDGDV  
 GM50270592 (1) MHLKFRSPSSFGNAFFLVGHVLDIRVERKNQRCFRASISCSAVRNGSIEQLSDARLIYSVAP  
 GM59700314 (1) -----MLKHDTGNGVFDTGMDP  
 LU61552369 (1) -----MKSMDKISYFYDGDV  
 os34631911 (1) -----MDASAGGGNSLPTAGADGAKRRVCYFYDAEV  
 ta60089198 (1) -----MDISAGGGNSLPTTGADGSKRRVCYFYDAEV  
 zm59324542 (1) -----MLAHDAGRGVFDSSGRDP

BN50000854 (30) GNYYYGQGHMPKPHRIRMAHSLIVHYNLHRRLL-----EISRPYLADAADIGRFHSPDYVDFLRS  
 BN51361834 (16) GSVYFGPNHPMKPHRLCMTTHLLIAYGLHMKM-----EVYRPHKAYPIEMAQFHSVDYVEFLQR  
     EST468 (16) GSVYYPNHPMKPHRLCMTNSLVLAYGLHNKM-----EYRPHKAYPVELAQFHSVDYVEFLGR  
 GM49753757 (16) GSVYFGAKHPMKPHRLCMTTHLLVLSYDLHKKM-----EYRPHKAYPVELAQFHSADYVEFLNR  
 GM50270592 (66) SMGNQESHPESHFRVPAIVNALEEMQLTSKFRGPEVIELQHFEPASVDDIASVHARAYVSGLEK  
 GM59700314 (18) GFLEVLKHPENS DRVKNLVSILKRGPI SPYI-----SWHLGTPAKIPELFSFHTPEYINELVE  
 LU61552369 (16) GSVYFGPNHPMKPHRLCMTTHLLVLSYDLHKKM-----EYRPHKAYPVELAQFHSADYVEFLHR  
 os34631911 (33) GNYYYGQGHMPKPHRIRMTHALLAHYGLLDQM-----QVLKPHPARDRDLCRFHADDYVAFLRS  
 ta60089198 (33) GNYYYGQGHMPKPHRIRMTHALLAHYGLLDEM-----QVLKPHPARDRDLCRFHADDYVSFLRS  
 zm59324542 (18) GFLDVLDQHPENADRVRNMVSI LRRGPIAHFL-----SWHSGRPAHASELLSFHSSEYIEELVQ

BN50000854 (89) VSPESVGDSSARNLRRFNVEDCPVFDGLFEFCRASAGSGIGAAVKLN-----QDADIAINWGG  
 BN51361834 (75) INPENKDL-FPNEMARYNLGEDCPVFDMEFECQIYAGATIDAARRLNN-----KLCDIAINWAG  
     EST468 (75) ITPESQEK-YAAELIRYNMGEDCPVFDNLFEEFCQIYAGGTIDAAHRLNH-----GLCDIAINWAG  
 GM49753757 (75) ITPDTQHL-FLNELTKYNLGEDCPVFDNLFEEFCQIYAGGTIDAAARRLNN-----QLCDIAINWAG  
 GM50270592 (131) VMDQAVEKGLIFLDG---SGPTYATATTFQESIVAAGAGLALVDSVACSKIKGDAPTGFALIR  
 GM59700314 (77) VDKEGGKQ-----LCGGTFLNPGSWDAALLAAGTTL SAMKHLN-----GDGKVSYALVR  
 LU61552369 (75) ITPDTQHL-YRDLARYNLGEDCPVFDNLFEEFCQIYAGGTIDAAARRLNN-----QLCDIAINWAG  
 os34631911 (92) VTPETQQD-QIRALKRFNVEDCPVFDGLYSFCQTYAGGSVGGAVKLN-----HGHDIAINWAG  
 ta60089198 (92) VTPETQQD-QIRALKRFNVEDCPVFDGLYSFCQTYAGGSVGGAVKLN-----HGHDIAINWAG  
 zm59324542 (77) TNATGAKK-----K-LCEGTFLNPGSWGAAALLAAGTTLSSAKHILD-----GQGNLAYALVR

## FIGURA 2B

BN50000854 (149) G-LHHAKKSEASGFCYVNDIVLGILELLKM--FRRVLYIDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 BN51361834 (134) G-LHHAKKCDASGFCYINDLVLGILELLKH--HPRVLYIDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 EST468 (134) G-LHHAKKCEASGFCYVNDLVLGILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 GM49753757 (134) G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 GM50270592 (192) PPGHHAQPQPMGFCIFGNVAIAARYSORVHGLKRFFIIDFDVHHGNGTDAFYDDPDDVFFLSEFH  
 GM59700314 (127) PPGHHAQPSLADGFCFLNAGLAVQLALDSG--CKKVAVIDIDVHYGNGTAEAGFYRSNKVLTISLH  
 LU61552369 (134) G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 os34631911 (150) G-LHHAKKCEASGFCYVNDIVIAILELLKY--HQRVLYVDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 ta60089198 (150) G-LHHAKKCEASGFCYVNDIVIAILELLKY--HQRVLYVDIDVHHGDDGVEEAFYTTDRVMTVSEFH  
 zm59324542 (128) PPGHHAQPDHADGFCFLNAGLAVQLALDSG--RAKVAVVDIDVHYGNGTAEAGFYRTDVLTMSLH

BN50000854 (211) KFGD---FFPGTGHIRDVGAEKGYALNVPLNDGMDDSEFRSLFRPLIQKVMVEYRPEAVVLQ  
 BN51361834 (196) KFGDK---FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLRDGIDDSSFNRLFRRAISKVVVEIYQPGAIVLQ  
 EST468 (196) KFGDY---FFPGTGDVKDGEREGKYAINVPLKDGIDDANFIRMERVVIQKVVVEYQPGAIVLQ  
 GM49753757 (196) KYGDS---FFPGTGDAKEIGEREGKYAINVPLKDGIDDSSFRLEFKTII SKVVVEYQPGAIVLQ  
 GM50270592 (257) QDGS-----YPGTGKDFDEVGSGDGETLNLPLPGSGDTAIRTVFDEVIQKVVVEYQPGAIVLQ  
 GM59700314 (191) MNHGSWGPSHPQSGVDELGEGEGYGNLNIPLPNGTGDKGYVHAFNELVPSIQKFGPDMIVLV  
 LU61552369 (196) KFGDL---FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLRDGIDDSSFNRLFKTII SKVVVEIYQPGAIVLQ  
 os34631911 (212) KFGD---YFPGTGDIRDIGHSKGYSLNVPLDDGIDDDESYQSLFKPIMGKVMVEFRPGAIVLQ  
 ta60089198 (212) KFGD---YFPGTGDIRDVGHSGKGYSLNVPLDDGIDDDESYQSLFKPIMGKVMVEFRPGAIVLQ  
 zm59324542 (192) MMHGSWGPSHPQSGVDEIGEGKGLGNLNIPLPNGSGDAGYEYAMNELVPSIDKFPQLLFLV  
**Consenso** (261) KFGD FFPGTGDVKEIGE EGKYALNVPL DGIDDSSF LFK II KVVVEIFQPGAIVLQ  
 326 390

BN50000854 (272) CGADSLSGDRLGCFNLSVKGHADCLRFLRSYN-----VPLMVLGGGGYTIRNVARCWCYETAVAV  
 BN51361834 (258) CGADSLARDRLGCFNLSIDGHAECVFKVKKFN-----IPLLVTGGGGYTKENVARCWTVEIGILL  
 EST468 (258) CGADSLAGDRLGCFNLSIDGHSECVFKVKKFN-----IPLLVTGGGGYTKENVARCWTVEIGVLY  
 GM49753757 (258) CGADSLAGDRLGCFNLSIDGHAECVSVKRFN-----LPLLVTGGGGYTKENVARCWTVEIGVLL  
 GM50270592 (317) AGYDGHVLDPLANLQYTTGTYYMLASSIKQLAKDLCCGRCVFFLEGGYNLKSLSYVADTFRALL  
 GM59700314 (256) LGQDSNAFDPNGRQCLTMEGYREIGRIVHLLAKRHSAGRLLIVQEGGYHVTYSAYCLHATLEGIL  
 LU61552369 (258) CGADSLAGDRLGCFNLSIDGHAECVFKVKKFN-----IPLLVTGGGGYTKENVARCWTVEIGVLL  
 os34631911 (273) CGADSLSGDRLGCFNLSIRGHAECVRFMRFSN-----VPLLJLGGGGYTIRNVARCWCYETGVAL  
 ta60089198 (273) CGADSLSGDRLGCFNLSIKGHAECVRFMRFSN-----VPVLLJLGGGGYTIRNVARCWCYETGVAL  
 zm59324542 (257) VGQDSSAFDPNGRQCLTMEGYRKIQIMRRLADRHNCNGQILVVQEGGYHITYSAYCLHATLEGVL

FIGURA 2C

BN50000854	(332)	GVEPDNKL.PYNEYFEYFGPDYTLHVEPG-PMENLNTPKMERICRNTLLEQLSGLIHAPSVPFQHT
BN51361834	(318)	DTELPNEIPDNDYIKYFGPDYSLKIPGG-HIENLTKSYISTIKAQILLNLRVIQHAPSVQMQEY
EST468	(318)	DTELPNEIPDNDYIKYFKPDCITLKTSGNHMENLNGKTYLSTIKQVMENLRRIAHAPSVQMHEV
GM49753757	(318)	DTELPNEIPQNDYIKYFAPEFSLKVPNG-PIENLSKSYLSTIKMQLVLENLRCIQHAPSVQMQEY
GM50270592	(382)	GDRSLASEFDNPNILYEEPSTKVQAIQKIKIHSL-----
GM59700314	(321)	NLPMPLLADPIAFT-----
LU61552369	(318)	DTELPNEIPENEYIKYFGPDYTLKIPSR-YIENLSKSYLSSLKVQVMENLRYIQHAPSVQMQEY
os34631911	(333)	GHELTDKMPNEYFEYFGPDYTLHVAPS-NMENKTRQQLDDIRSRLLDNLSKLRHAPSVQFQER
ta60089198	(333)	GHELTDKMPLNEHYEYFGPDYTLHVAPS-NMENKTHRHLDEIRSRLENLTKLRHAPSVQFQER
zm59324542	(322)	DLEAPLLDDPIAYYPED-DKYTMKVVDMIKSYWKESVFFLKEI-----
BN50000854	(396)	PPVNRVLDEPEE-----DLEKR--PKPRIWSGTANYESDSDDDDEKP
BN51361834	(382)	PPDFYIPDFDEDERNP-----DVRVQRSRDKQIQRDDDEYFDGDKNDAS-
EST468	(383)	PRPTYIPEFDEDELNP-----DERMDQHTQDKHIQREEEYEDDDNDNDHDM
GM49753757	(382)	PPDFYIPEFDEEQNP-----DERIDQHTQDKHIQORDDEYDGDNDNDQMN
GM50270592	(418)	-----
GM59700314	(335)	-----
LU61552369	(382)	PPDFYIPDFDEEQNP-----DERMDQHTRDKQVQRDDEYDGDNDNDPTD
os34631911	(397)	PPEAELPEQDEQEDPDERHHADSDVEMDDVKPLDDSGRRSSIQNVRVKRESAETDAA-DQDGNR
ta60089198	(397)	PPEAEQEQDEQENPDERHHADSDVEMDDAKPLEDSERRTSTQGARVKRESAETEVTIDQDNG
zm59324542	(364)	-----
BN50000854	(435)	LGGFSGING-PTMDRSTGEMEDDSAEPEVDPSS-----
BN51361834	(427)	-----
EST468	(429)	DDS-----
GM49753757	(428)	IS-----
GM50270592	(418)	-----
GM59700314	(335)	-----
LU61552369	(428)	RS-----
os34631911	(461)	VAAENTKGTEPAADGVGSSKQTVPTDASAMAIDEFGSLKVEPDNSNKLQDQPSVHQKT-
ta60089198	(462)	VASEQVRGPEPVADGVGSSKQNPPIIDASPMADGPAVVRAEPEPERSNKLQEQQALHQKP-
zm59324542	(364)	-----

RESUMO

“CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA OU UMA PLANTA  
TRANSGÊNICA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO  
ISOLADO, E, MÉTODOS DE PRODUZIR UMA PLANTA  
5 TRANSGÊNICA, E DE AUMENTAR UM CRESCIMENTO E/OU  
RENDIMENTO DA PLANTA SOB CONDIÇÕES NORMAIS OU  
LIMITADAS EM ÁGUA E/OU AUMENTAR UMA TOLERÂNCIA DA  
PLANTA A UM ESTRESSE AMBIENTAL”

10 Polinucleotídeos são divulgados que são capazes de realçar o  
crescimento, rendimento sob condições limitadas em água e/ou tolerância  
aumentada a um estresse ambiental de um planta transformada para conter  
tais polinucleotídeos. Também são fornecidos métodos de usar tais  
polinucleotídeos e plantas transgênicas e produtos agrícolas, incluindo  
sementes, contendo tais polinucleotídeos como transgenes.