



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

(11) PI 1005743-9 B1



(22) Data do Depósito: 20/12/2010

(45) Data de Concessão: 26/11/2019

(54) Título: VETOR DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PLANTAS TOLERANTES A ESTRESSES AMBIENTAIS E SEUS USOS

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

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP.

(72) Inventor(es): MARCELO MENOSSEI TEIXEIRA; KEVIN BEGUY PADILLA; EDUARDO D. MARIANO; CAROLINA GIMILIANI LEMBKE; GLÁUCIA MENDES SOUZA.

(57) Resumo: VETOR DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PLANTAS TOLERANTES A ESTRESSES AMBIENTAIS E SEUS USOS. As plantas são influenciadas por um grande número de fatores ambientais bióticos e abióticos e recorrentemente estresses abióticos são mais graves, afetando todas as funções da planta, resultando em redução do crescimento e da produtividade. Nesse sentido, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância abióticos são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares tolerantes à seca. Dessa forma, a presente invenção proporciona um método de produção de plantas que contém em suas células uma sequência de nucleotídeos de cana-de-açúcar e a superexpressão desse gene leva a planta em questão à maior tolerância a estresses abióticos. De uma forma mais ampla, descreve-se um polinucleotídeo que codifica a proteína de cana-de-açúcar, o qual é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas. Verifica-se que este gene confere tolerância a diferentes estresses abióticos.

“VETOR DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PLANTAS TOLERANTES A ESTRESSES AMBIENTAIS E SEUS USOS”

CAMPO DA INVENÇÃO

As plantas são influenciadas por um grande número de fatores ambientais, bióticos e abióticos e recorrentemente estresses abióticos, como seca, salinidade, temperatura, poluição, radiação e etc, são mais graves e afetam todas as funções da planta, resultando em redução do crescimento e da produtividade. Estima-se que esse tipo de estresse afete geralmente fatores fisiológicos, bioquímicos e os níveis morfológicos, podendo reduzir a produtividade em 50% e em alguns casos até 70%. Isso tem levado a esforços no entendimento da resposta das plantas a estresses.

Nesse sentido, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância abióticos são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares tolerantes a diferentes estresses abióticos. Dessa forma, a presente invenção descreve um método para produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais graças à introdução de um vetor que compreende um gene que codifica nova proteína de cana-de-açúcar, de função até então desconhecida, além da construção do vetor e seus usos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Um dos principais problemas na agricultura é a seca, que de longe é o estresse ambiental mais importante. Muitos esforços têm sido feitos para melhorar a produtividade das plantas sob condições limitantes de água. Nas ultimas décadas tem-se investido fortemente na produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses, dentre os quais se destacam a seca e o estresse salino. Isso tem permitido compreender melhor as respostas fisiológicas e moleculares das plantas aos estresses, abrindo perspectivas de aumentar o rendimento em condições de estresses.

Dentre as tecnologias para produção de plantas tolerantes, a transformação por *Agrobacterium* (Hooykaas PJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* 19: 15-38; Barton KA, Chilton MD (1983) *Agrobacterium* Ti plasmids

as vectors for plant genetic engineering. *Methods Enzymol* 101: 527-539), a transferência direta de genes em protoplastos (Gharti-Chhetri GB, Cherdshewasart W, Dewulf J, Paszkowski J, Jacobs M, et al. (1990) Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. 3. Temporal/spatial fate of NPTII gene integration, its inheritance and factors affecting these processes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 14: 687-696; Lyznik LA, Peng JY, Hodges TK (1991) Simplified procedure for transient transformation of plant protoplasts using polyethylene glycol treatment. *Biotechniques* 10: 294-300; Rodenburg KW, de Groot MJ, Schilperoort RA, Hooykaas PJ (1989) Single-stranded DNA used as an efficient new vehicle for transformation of plant protoplasts. *Plant Mol Biol* 13: 711-719 e Ballas N, Zakai N, Loyter A (1987) Transient expression of the plasmid pCaMVCAT in plant protoplasts following transformation with polyethyleneglycol. *Exp Cell Res* 170: 228-234) e o bombardeamento de partículas (Klein TM, Wolf ED, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73) são as mais utilizadas.

Nos últimos anos tem-se obtido grande avanço nas tecnologias para a transformação de plantas e as pesquisas têm se voltado para a necessidade de desenvolver eficazes métodos de transformação genética das principais espécies de interesse experimental e econômico. A agrotransformação tem ganhado grande aceitação pela facilidade do método de transformação e a alta taxa de plantas transgênicas geradas a partir desse método. Por outro lado, o tabaco tem sido utilizado amplamente como ferramenta de transformação gênica pela facilidade de transformação e rápida obtenção de gerações transformadas. Desta forma, genes de diferentes espécies podem ser avaliados inicialmente em tabaco, pela facilidade e rapidez na produção e análise das plantas transgênicas. Isso tem ocorrido com genes de cereais, produtos hortícolas, plantas ornamentais, medicinais, árvores frutíferas, pastagens, dentre outros. Assim, embora o tabaco seja uma planta dicotiledônea, ele oferece evidência clara que genes de monocotiledôneas, como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz, possam conferir tolerância a estresses abióticos tanto em plantas monocotiledôneas como dicotiledôneas.

Nos últimos anos, com a chegada de novas tecnologias como o seqüenciamento genômico, microarrays e outras tecnologias (Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing

methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 387-402) têm aumentado as informações sobre os genes, até o ponto do patenteamento de genomas completos (**Stix G (2006) Owing the stuff of life. *Sci Am* 294: 76-83** e **Stott M, Valentine J (2003) Impact of gene patenting on R&D and commerce. *Nat Biotechnol* 21: 729-731; author reply 731**). A partir dessas novas abordagens, um grande número de genes vem sendo identificado. Dessa forma, tem-se buscado cada vez mais o patenteamento de plantas ricas em alguns nutrientes e vitaminas, que apresentem aumento na produção ou na tolerância a estresses, entre outros.

Dentro dos estresses, os de tipo abiótico têm tido um interesse particular para aplicação na agricultura devido ao efeito negativo sobre o desenvolvimento e a produtividade em geral, bem como pelo temor às mudanças climáticas. Um dos tipos de estresses mais estudados e conseqüentemente com alto número de patentes é a seca, que é a principal causa de déficit hídrico ou estresse osmótico nas plantas (**Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, et al. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105: 1-14**).

Apesar do avanço na identificação de genes nos mais diversos genomas, existe um grande grupo de genes em todo genoma que ainda não se conhece sua função. Esses genes podem estar envolvidos em muitas das mais importantes vias de resposta da planta a estresses, crescimento, fotossíntese, etc. Uma das mais recentes técnicas denominada microarrays ou chips de DNA tem permitido associar função a esses genes até então desconhecidos. Essa técnica de baixo custo permite conhecer a seqüências de DNA de centenas de milhares de genes distintos usando *tags* moleculares fluorescentes que se acendem quando se liga uma fita complementar. Desta forma os chips têm permitido conhecer e identificar genes envolvidos em diferentes processos da planta, como resposta a estresses abióticos, regulação gênica, acúmulo de sacarose, além de resistência a pragas, tolerância à escassez de água, interação planta-patógeno e etc.

Os mecanismos de tolerância à seca em plantas têm semelhanças com outros tipos de estresses (**Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803**), uma vez que as mesmas proteínas e osmoprotetores estão envolvidos em

respostas moleculares para diferentes tipos de estresse. Adicionalmente, a maioria dos estresses abióticos começa com um tipo de estresse, por exemplo, osmótico que logo desencadeia os outros. Isto implica que um gene ou via de transdução de sinais identificados como resposta a um estresse específico pode estar envolvido nas respostas de vários outros tipos de estresses

5 (Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) e Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273).

Ao nível celular, as membranas celulares servem como uma barreira permeável para a perda de água e de algumas moléculas importantes. Porém, durante o estresse osmótico, a disponibilidade de água intercelular é restrita, o que altera as concentrações extracelulares de

10 solutos, levando a um desequilíbrio osmótico. Desta forma ocorre um fluxo de água para fora das células, causando uma diminuição na turgência da célula e um aumento nas concentrações intracelulares de solutos. As espécies reativas de oxigênio e toxinas geradas durante esse processo também podem causar um dano extensivo para a célula.

Muitas são as patentes que descrevem diferentes proteínas capazes de conferir

15 tolerância a fatores abióticos como seca e estresse salino, tais como os elementos de ligação a DNA ativados em resposta a desidratação (DREB/CBF), os quais compõem uma importante família com um papel chave na regulação de transdução de sinal induzida pelo estresse (Oh S, Song S, Kim Y, Jang H, Kim S, Kim M, Kim Y, Nahm B, Kim J. (2005). *Arabidopsis CBF3/DREB1A and abf3 in transgenic Rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant*

20 *Physiology*. 138:341-351; Stockinger E, Gilmour S, Thomashow M. (1997). *Arabidopsis Thaliana CBF1 Encodes An AP2 Domain-Containing Transcription Activator That Binds To The C-Repeat/DRE, A Cis-Acting DNA Regulatory Element That Stimulates Transcription In Response To Low Temperature And Water Deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:1035-1040). Proteínas CBF/DREB possuem diferentes domínios e foram identificadas em

25 diferentes espécies. Os documentos **US7368630**, **US7259297** e **US7253000** utilizam estes importantes reguladores da transcrição para a produção de plantas transgênicas tolerantes ao estresse hídrico.

A patente **US7368630** descreve um método para usar o gene *DREB1A* para produzir uma linha de células vegetais, tecidos ou plantas com este fator de transcrição, assim como os genes induzidos por desidratação a partir de estudos de microarrays. Por sua vez, o documento **US7259297**, descreve plantas transgênicas criadas pela introdução de um gene que codifica um fator de transcrição DREB que se liga ao elemento de resposta a seca DRE/CRT (Drought Response Element/Crepeat) e ativa a transcrição de genes localizados em promotores com o referido motivo DRE. Segundo essa patente, a superexpressão do fator de transcrição DREB ativa os genes *Rd29A*, *Rd29B*, *Rd17*, *Rd22*, *DREB1A*, *Cor6*, *Cor15a*, *Erd1* e *Kin1*, induzindo uma resposta rápida na planta quando esta submetida ao estresse.

Da mesma forma, a patente **US7253000** compreende uma seqüência de ácido nucléico que utiliza um dos genes pertencentes ao grupo CBF (C-repeat/dehydration-responsive element binding factor, que é um outro nome dado aos fatores DREB).

Outras patentes descrevem o uso de vários fatores de transcrição envolvidos na tolerância ao estresse em plantas como, por exemplo, a **WO2005024028** e **JP2006158402**, que empregam fatores de transcrição tipo dedo de zinco (*Zinc finger*) para conferir tolerância a estresse hídrico nas plantas. Por sua vez, o documento **US2008163397**, utilizou o fator de transcrição *CAAT-binding*, conferindo tolerância a seca e ao estresse por frio, utilizando o domínio B do fator de transcrição. Da mesma forma, na patente **US2009265813** utiliza-se o fator de transcrição AP2, para obtenção de plantas transgênicas relacionadas com múltiplas características, incluindo o crescimento reforçado da raiz e obtendo tolerância à seca como resultado final.

As patentes aqui mencionadas são reflexo do potencial biotecnológico dos genes que codificam fatores de transcrição, proteínas quinases e outras proteínas envolvidas nas respostas das plantas à seca. Essas proteínas atuam protegendo diretamente componentes celulares durante a desidratação, bem como amplificando o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos de defesa. Nenhum documento apresenta proteção sobre genes relacionados ao gene *Scdr1*, cuja seqüência encontra-se descrita em SEQ ID: 1 (Anexo 1 A).

Apesar do crescimento em pesquisas com cana-de-açúcar, são poucos os exemplos de invenções que utilizam genes de cana para produção de plantas com maior tolerância a estresses abióticos (Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lutz C, Lutz-Meindl U (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Microcystis denticulata*. J Exp Bot 60: 939-954 e Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, et al. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 130: 218-229). E o uso de genes de cana que dão tolerância a estresses abióticos, em contraponto a genes de outras espécies, permite a produção de plantas transgênicas da cana contendo genes da própria cana, os quais têm maior aceitação pelos consumidores. De fato, 70% dos consumidores dão suporte a modificações genéticas envolvendo genes da própria espécie, em contraste com o suporte de 26% quando se tratam de genes de outras espécies (Rommens CM (2010) Barriers and paths to market for genetically engineered crops. *Plant Biotechnology Journal* 8: 101-111).

Portanto, esta invenção relaciona-se com a direta manipulação de uma sequência de DNA que codifica uma proteína de cana-de-açúcar. O conhecimento prévio no estado da arte não permite associar qualquer função específica ao gene alvo desta invenção. Esta invenção descreve também a construção de vetores que contém a sequência da proteína de cana-de-açúcar, bem como um processo de produção de plantas transgênicas de forma a produzir um fenótipo de tolerância a estresse hídrico, salino, maior biomassa e maior fotossíntese, dentre outros possíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método de produção de plantas que contém em suas células uma sequência de nucleotídeos de cana-de-açúcar e a expressão desse gene leva à maior tolerância a estresses abióticos à planta em questão.

Em uma forma mais ampla, o polinucleotídeo codificando a proteína de cana-de-açúcar é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um polinucleotídeo de DNA recombinante no sentido 5' para 3', que compreende um promotor que funciona em plantas, operacionalmente ligado a um

segundo polinucleotídeo que codifica uma proteína de cana, operavelmente ligado ao terminador que finaliza a transcrição do polinucleotídeo de DNA fornecendo um sítio de poliadenilação.

5 A invenção também descreve uma seqüência de DNA recombinante em que o promotor é selecionado do grupo constituído por promotores induzíveis, promotores constitutivos, promotores regulados temporalmente, promotores com preferência por tecidos, promotores de estresses específicos, promotores induzíveis por seca, promotores induzíveis pelo déficit de água, e os promotores tecido-específicos.

10 Também são descritas células vegetais e plantas que contêm em seu genoma moléculas de DNA recombinante, tal como descrito e os propágulos e descendentes delas produzidas. As plantas incluem, mas não estão limitadas a plantas de cultivo, monocotiledôneas ou dicotiledôneas e dentre elas podem-se incluir cana-de-açúcar, soja, milho, canola, arroz, algodão, cevada, aveia, grama, trigo, pinhão manso, mangueira, goiabeira, limoeiro, abacateiro, laranjeira, ameixeira, pitagueira, jabuticabeira, macieira, pessegueira, batateira, ervilheira, tomateiro,
15 roseira, girassol, feijão, eucalipto, abacate, morango, pêra, maçã, goiaba, cacau, limão, maracujá, palma forrageira, mamona, mandioca, seringueira, mate, jacarandá, café, abóbora, melancia, pêssego, pitanga e caju.

A invenção também proporciona um método para produção de plantas tolerantes aos estresses abióticos, graças à transformação genética com uma molécula de DNA recombinante
20 que expressa uma proteína de cana, bem como as plantas e suas células e propágulos, como sementes, contiverem em seu genoma moléculas desse DNA recombinante.

Tais plantas apresentam uma ou mais das seguintes propriedades: uma maior taxa de crescimento em condições onde a seca e/ou o estresse salino seriam limitantes para o crescimento de uma planta não-transformada da mesma espécie, uma maior taxa de crescimento em condições onde a água seria limitante para o crescimento de uma planta não-transformada da mesma espécie, uma maior taxa de crescimento, sob condições em que o aumento de sais ou íons no solo e / ou água seria limitante para o crescimento de uma planta não-transformada da mesma espécie, maior porcentagem de plantas sobreviventes após um

período prolongado de seca ou sob estresse salino do que uma planta não-transformada da mesma espécie, um rendimento maior quando comparado a uma planta não-transformada da mesma espécie, ou maior tolerância à seca em comparação com uma planta não-transformada da mesma espécie.

5 A presente invenção compreende a propagação de plantas desta invenção, por exemplo, com a finalidade de gerar sementes, por simplesmente plantar tais sementes no solo, ou bem a partir de brotação, como é o caso de uso de toletes em cana-de-açúcar, e que permite a essas plantas crescer, por exemplo, sob condições de estresse. Mais especificamente, esta invenção fornece um método para produzir uma planta que tem como uma das características,
 10 tais como tolerância a estresses abióticos, aumento ou incremento no rendimento da massa de raízes. A invenção compreende as etapas de inserir no genoma de uma célula de planta, a construção de uma molécula de DNA recombinante compreendendo um gene cana-de-açúcar, a obtenção de uma célula de planta transformada ou células transformadas, a regeneração de plantas transformadas de células vegetais e a seleção de plantas que apresentam melhores
 15 características agrônômicas. Uma das características da invenção é o fato das plantas selecionadas apresentarem maior tolerância a estresses abióticos selecionado do grupo consistindo de tolerância ao estresse salino, tolerância à seca e sobrevivência após o a combinação de estresses abióticos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 Figura 1: Avaliação da expressão por real-time PCR do gene *Scdr1* em plantas submetidas a estresse hídrico por 24, 72 and 120 horas. V1: SP83-5073, V2: SP90-1638, V3: SP83-2847 and V4: SP86-155. V1 e V3 são variedades de cana-de-açúcar tolerantes, e V2 e V4 são variedades de cana-de-açúcar sensíveis. No eixo horizontal são indicados os quatro diferentes grupos analisados e a quantidade de horas a que foram submetidos à seca, enquanto o eixo vertical
 25 demonstra a proporção de eventos. O asterisco, por sua vez, indica amostras com valores com diferença estatisticamente significativa.

Figura 2: Efeito de manitol e NaCl sob a germinação de plantas contendo a SEQ ID NO: 1. Porcentagem de germinação de plantas transgênicas de tabaco contendo a SEQ ID NO: 1 (*Scdr1*-

1 (), Scdr1-2 () e Scdr1-3 ()) e plantas selvagens (wt ()) em diferentes concentrações de manitol e NaCl, avaliadas ao longo de 15 dias. (A): controle; (B): 200 mM manitol; (C): 300 mM manitol; (D): 100 mM NaCl e E): 175 mM NaCl. Em todos os gráficos, o eixo vertical representa a porcentagem de germinação e o eixo horizontal representa a quantidade de após o plantio.

Figura 3: Efeitos dos estresses salino e hídrico sobre a fotossíntese (A), expressa em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, compreendendo, na figura, os gráficos A, B e C; Concentração interna de CO_2 (C_i), expressa em $\mu\text{mol mol}^{-1}$, compreendendo, na figura, os gráficos D, E e F; Condutância estomática (gs), expressa em $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, compreendendo, na figura, os gráficos G, H e I; e taxa de transpiração de plantas selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 (E), expressa em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, compreendendo, na figura, os gráficos J, K e L. Plantas de 30 dias foram submetidas a 10 dias de irrigação com 200 mM manitol ou 175 mM NaCl e após isso reidratadas por 3 dias com água. Os gráficos A, D, G e J representam a situação Controle; os gráficos B, E, H e K representam a situação de Seca, na qual houve tratamento com 200 mM mannitol; os gráficos C, F, I e L representam a situação de estresse salino, na qual houve tratamento com 175 mM NaCl. No eixo horizontal é indicado o tempo de duração do estresse.

Figura 4: Conteúdo de água em folhas estressadas de plantas selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1. Plantas de 30 dias foram expostas durante 10 dias a 200 mM mannitol ou 175 mM NaCl, e após o estresse foram irrigadas com água por 3 dias. No tratamento controle as plantas foram irrigadas durante o experimento todo com água ($n=5$). ***, ** e * indicam diferenças significativas relativas ao controle $P < 0.0001$, $P < 0.001$, e $P < 0.01$, respectivamente. Nos gráfico apresentados, as cores referentes aos grupos analisados são:  wt,  Scdr-1,  Scdr-2 e  Scdr-3. O gráfico A representa a situação Controle, B representa a situação de Estresse Hídrico e C representa a situação de Estresse Salino. No eixo vertical é indicado o conteúdo de água na folha.

Figura 5: Efeitos da seca e estresse salino sob massa seca das plantas selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1. Plantas de 30 dias foram expostas durante 10 dias a 200 mM mannitol ou 175 mM NaCl, e reidratadas por 3 dias com água. ***, ** e * indicam diferenças

significativas relativas ao controle $P < 0.0001$, $P < 0.001$, e $P < 0.01$, respectivamente. Nos gráficos apresentados, as cores referentes aos grupos analisados são: ■ wt, □ Scdr-1, ■ Scdr-2 e □ Scdr-3. O gráfico A representa a situação Controle, B representa a situação de Estresse Hídrico e C representa a situação de Estresse Salino. No eixo vertical é indicada a quantidade de massa seca em gramas (g).

Figura 6: Fenótipo de plantas de tabaco selvagens (wt) e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 mantidas sob estresse hídrico e salino. Linha Superior: wt e plantas de três eventos independentes contendo a SEQ ID NO: 1 (Scdr1-1, Scdr1-2 e Scdr1-3) crescidas em condições normais por 5 semanas. Linha do meio: plantas irrigadas com 200 mM manitol por 10 dias e irrigadas com água novamente por 3 dias. Linha inferior: plantas irrigadas por 10 dias com 175 mM NaCl e irrigadas novamente por 3 dias.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método para produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais graças à introdução de um gene que codifica uma nova proteína de cana-de-açúcar, de função até então desconhecida. O gene, nomeado *Scdr1* (*sugarcane drought-related*), é descrito na sequência SEQ ID NO: 1 (Anexo 1A), e a proteína deduzida a partir dessa sequência de DNA está indicada na SEQ ID NO:2 (Anexo 1B).

O invento descrito neste documento refere-se a um vetor de DNA recombinante compreendendo a sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 1, útil para produzir plantas transgênicas e um método para produção de plantas geneticamente modificadas que superexpressam uma molécula de ácido nucléico, um novo gene de cana de açúcar, que compreende a SEQ ID NO: 1, envolvida na resposta das plantas a estresses abióticos, e cuja superexpressão produz uma melhora significativa na resposta da planta a esses estresses. Assim, determina-se que o gene indicado na SEQ ID NO:1 controla direta ou indiretamente a resposta de plantas contra esses estresses.

Como tal, as aplicações da invenção incluem, mas não estão limitadas, à melhoria da produção de plantas que sejam tolerantes a esses estresses abióticos. Da mesma forma, a invenção compreende as seqüências com identidade igual ou superior a 60% à SEQ ID NO: 1, mas não limitantes a somente elas.

- 5 A seqüência de DNA descrita em SEQ ID NO: 1 compreende a região codificante do gene *Scdr1* que é usada como parte de um DNA quimérico capaz de aumentar a expressão em células vegetais.

O vetor de transformação de plantas usado para introduzir o ácido nucléico na célula vegetal pode ser um plasmídeo, em que o DNA SEQ ID NO:1 é inserido em sítios de clivagem de
10 endonucleases de restrição ou por recombinação mediada por outros tipos de proteína. O DNA é inserido no vetor de clonagem utilizando procedimentos padrão facilmente conhecidos. Isso geralmente envolve o uso de enzimas de restrição e ligases do DNA, conforme descrito, por exemplo, por Sambrook et al (**Wood EJ (1983) Molecular-Cloning - a Laboratory Manual - Maniatis,T, Fritsch,Ef, Sambrook,J. Biochemical Education 11: 82-82**). O plasmídeo resultante,
15 que inclui a SEQ ID NO:1 pode então ser usado para transformar uma célula vegetal, plantas ou partes de plantas por métodos convencionais de transformação.

Para a transformação de plantas, o plasmídeo de preferência também inclui um gene marcador de seleção na transformação de plantas, embora existam métodos que prescindam do uso desse tipo de gene marcador. Marcadores seleção de vegetais comumente usados incluem
20 o gene de resistência a canamicina, (neomicina fosfotransferase II ou nptII), o gene de resistência a higromicina (higromicina fosfotransferase ou HPT), o gene de fosfinotricina acetil transferase (bar), o gene 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), ou gene da acetolactato sintase (ALS). Na presente invenção, o marcador de seleção é o gene *NptII*, que permite a seleção dos transformantes com canamicina.

- 25 O plasmídeo também pode incluir um gene repórter que fornece uma indicação clara de que a transformação genética foi efetuada através da detecção da atividade da proteína codificada pelo gene repórter. Os genes repórteres mais comumente utilizados são os que codificam a beta-glucuronidase (GUS), a luciferase e a proteína verde fluorescente (GFP). Genes

repórter são muitas vezes colocados em frame da região promotora e nas proximidades do gene de interesse para assegurar que elas são expressas em conjunto e não separadas por eventos do crossover.

O plasmídeo, de preferência também inclui os promotores adequados para a expressão do ácido nucléico indicado na SEQ ID NO: 1 e também para a expressão do gene marcador de seleção, assim como o gene repórter. O promotor do vírus do mosaico couve-flor 35S (CaMV 35S) é comumente utilizado para a transformação de plantas, bem como o do gene da actina 1 de arroz (Act1), da ubiquitina 1 (Ubi1), o promotor do gene da alfa-amilase, e promotores de genes induzidos por estresse. Na presente invenção, o promotor utilizado é o promotor CaMV 35S, mas outros promotores também podem ser utilizados.

No plasmídeo, o DNA descrito em SEQ ID NO:1 pode estar sob o controle de um promotor constitutivo ou pode estar sob o controle do promotor do mesmo gene ou de um promotor diferente. Para a transformação de plantas, o plasmídeo de preferência inclui também uma molécula de ácido nucléico codificando o terminator, como a região 3' não codificante dos genes que codificam um inibidor de protease de actina, do vírus do mosaico da couve-flor, ou da nopalina (NOS). Na presente invenção, o plasmídeo inclui o terminador da nopalina sintase (NOS).

O plasmídeo é de preferência um vetor de transformação de plantas binário em que os genes de interesse são inseridos dentro das bordas do T-DNA. Exemplos de tais vetores de transformação de plantas que podem ser usados na presente invenção são vetores obtidos a partir de fontes comerciais, tais como a serie pCambia, pBI121 ou pGreenII que contém uma origem RK2 de baixa replicação, o gene marcador da neomicina-fosfotransferase (*nptII*), e o terminador da nopalina sintase (NOS), promotor constitutivo e um sinal de 3' NOS de poliadenilação.

Para a transformação das plantas, qualquer método adequado para a transformação de monocotiledôneas ou dicotiledôneas pode ser usado, como por exemplo a transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento de partículas (também conhecida como transformação de biobalística). Na transformação mediada por *Agrobacterium*, as células

vegetais são colocadas em contato com um inóculo de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o DNA indicado na SEQ ID NO: 1 da invenção, por exemplo, através da inoculação de células de plantas com uma suspensão de bactérias transformadas. Bactérias do gênero *Agrobacterium* que podem ser utilizados para transformar células vegetais incluem espécies de *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens* de preferência cepas de *A. tumefaciens* LBA4404, EHA105 ou GV301. *Agrobacterium spp.* são transformadas com o plasmídeo por métodos convencionais conhecidos.

Por sua vez, utilizando-se um protocolo de transformação de discos foliares, bactérias de *A. tumefaciens* com o DNA indicado na SEQ ID NO:1 clonado no vetor binário são cultivadas em um meio de crescimento na presença de antibióticos, como por exemplo, canamicina, para selecionar as células bacterianas que possuem o plasmídeo binário. Em seguida, folhas de tabaco selvagem são esterilizadas superficialmente, cortadas em pequenos discos e incubadas numa suspensão de *A. tumefaciens* por um tempo adequado. Diferentes tecidos podem ser utilizados para a transformação, tais como folhas, talo, flor dentre outros. Após a incubação com *A. tumefaciens* as folhas infectadas são transferidas ao meio de cultura *in vitro* por determinado período de tempo. A seleção das plantas transgênicas é iniciada colocando-se as plantas infectadas no meio de seleção *in vitro* com antibiótico. Após o desenvolvimento de plântulas com raízes ocorre a transferência para solo e o crescimento em câmara de crescimento.

Adicionalmente, a presente invenção refere-se a produção de plantas transgênicas transformadas com plasmídeos contendo a seqüência indicada em SEQ ID NO:1, aumentando sua tolerância a estresses abióticos, como seca e alta salinidade.

Outra abordagem para se aumentar os níveis de expressão de SEQ ID NO: 1 pode ser a produção de plantas geneticamente modificadas que superexpressem genes que induzam a atividade do promotor do gene endógeno, como é o caso de genes que codificam fatores de transcrição.

Assim, a invenção descreve o método para produção de plantas transgênicas que contém em suas células um gene quimérico com capacidade de expressão em células vegetais, assim

como as subseqüentes gerações compreendendo uma seqüência de DNA de SEQ ID NO: 1 e seqüências de DNA que permitam a expressão da referida proteína em células vegetais.

Plantas transgênicas, de acordo com a invenção, incluem, sem limitação, os cereais, como trigo, cevada, milho, arroz, aveia, gramíneas forrageiras, turfa, outras monocotiledôneas como cana-de-açúcar, miscanthus, ou qualquer espécie de cultura de outros alimentos como o feijão, a soja, ervilha, tomate, colza, bem como outras espécies de interesse econômico, como o tabaco, a laranja, etc.

EXEMPLOS

Exemplo 1: AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO GENE *SCDR1* DE CANA-DE-AÇÚCAR

Para avaliar o padrão de expressão do gene *Scdr1* sob seca foi feito um Real time-PCR quantitativo conforme descrito por Rocha *et al* (Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Vencio RZN, Vicentini R, et al. (2007) **Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. BMC Genomics 8**) utilizando folhas de variedades de cana com maior tolerância à seca (SP83-5073 e SP83-2847) e duas com maior sensibilidade à seca (SP86-155 e SP90-1638) mantidas sob irrigação ou em sequeiro (com suspensão de rega, equivalente à estresse por seca). Como gene de referência foi utilizado o gene da poliubiquitina de cana.

A expressão sob seca (sequeiro) foi determinada a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak KJ, Schmittgen TD (2001) **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408**), utilizando amostras não submetidas ao estresse (irrigadas) como controle. A significância estatística das diferenças de expressão gênica relativas foi determinada assumindo-se um modelo log-normal que calcula a probabilidade Pr (amostra > referência) e Pr (amostra < referência) para genes induzidos e reprimidos, respectivamente. O Perfil de expressão foi considerado válido quando $P \geq 0,95$. Para cada tratamento foram usadas folhas de seis plantas.

O resultado da análise mostrou que a expressão do gene *Scdr1* foi fortemente induzida após 72 horas de estresse nas variedades tolerantes à seca, sendo reprimido em praticamente

todas as demais amostras avaliadas (Figura 1). Esses dados sugeriram que o gene *Scdr1* poderia estar envolvido na tolerância à seca em cana.

Exemplo2: CLONAGEM DA SEQ ID NO: 1 DE CANA-DE-AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE UM CASSETE RECOMBINANTE.

- 5 Um clone com seqüência do gene *Scdr1* de cana-de-açúcar foi obtido do Brazilian Clone Collection Center (BCCCENTER, Jaboticabal, Brasil). A partir desse DNA a seqüência codificante completa, indicada na SEQ ID NO: 1 (Anexo 1), foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos 5'-GGATCCCTCATCGCCAGCTCCCAT-3' e 5'-TCTAGACCTGTGCAGTGTCTGGATTATTC-3', e clonada no vetor pGEMT-Easy (Promega, EUA).
- 10 Posteriormente, a região codificante do gene *Scdr1* contendo a SEQ ID NO: 1 foi retirada com as enzimas *BamHI* e *XbaI* e inserida no vetor pRT104 digerido com as mesmas enzimas. O cassete de expressão foi liberado pela digestão com *HindIII* e clonado no vetor de expressão pCAMBIA 2301 (Cambia, Australia), também digerido com a mesma enzima. A construção recombinante final resultante (pCAMBIA2301::*Scdr1*) foi introduzida em *Agrobacterium*
- 15 *tumefaciens* cepa GV3101 (CLONTECH, EUA).

Exemplo 3: PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

- Sementes selvagens de tabaco (*Nicotiana tabacum*, var. *SR1*) foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,9% (w/v) de agar. As plântulas foram transplantadas para solo, composto de Baccto (Michigan Peat Co., EUA) e areia (4:1, v/v) em
- 20 potes de 325 mL. Quando as plantas desenvolveram entre 10 e 12 folhas, foram transplantadas para potes de 1 L contendo a mesma mistura antes mencionada.

As plantas foram crescidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro ($300\text{--}400\ \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) a 25°C e umidade relativa de 75–80%. Para a produção de sementes, as plantas foram induzidas à floração por extensão do tempo de exposição à luz.

- 25 Folhas de tabaco selvagem foram esterilizadas em sua superfície, cortadas em pequenos discos e incubadas numa suspensão de *A. tumefaciens* por 5 a 20 min. Após isto, as folhas

infetadas foram transferidas ao meio MS (suplementado com 2 mg L⁻¹ benzil-adenina e 0,1 mg L⁻¹ ácido naftilacético) por 3 dias.

A seleção das plantas transgênicas foi iniciada colocando as plantas infetadas no meio de seleção (MS, 2 mg/L⁻¹ benziladenina, 0,1 mg/L⁻¹ ácido naftilacético e 100 mg/L⁻¹ canamicina, ou 30 mg/L⁻¹ higromicina e 500 mg/L⁻¹ carbenicilina). Os explantes que então se desenvolveram foram transferidas para o meio MS com 0,1 mg/L⁻¹ ácido 3-indol acético, 100 mg/L⁻¹ canamicina, ou 30 mg/L⁻¹ higromicina, e 500 mg/L⁻¹ carbenicillina enquanto as plantas enraizadas foram transferidas para solo e crescidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro (300–400 μmol fótons m⁻² s⁻¹) à 25°C e umidade relativa de 75–80%.

Exemplo 4: ANÁLISES DA PRESENÇA DA SEQ ID NO: 1 EM PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A caracterização inicial das plantas enraizadas e transferidas para solo foi feita primeiramente por o ensaio histoquímico utilizando-se o X-Gluc como substrato para a detecção do gene beta-glucuronidase, também inserido no cassette de expressão.

Observou-se que um grande número de plantas apresentou forte coloração azul, as quais foram utilizadas para confirmar a integração do transgene contendo o gene *Scdr1* indicado na SEQ ID NO:1 por PCR, utilizando-se DNA genômico como molde.

Em seguida foi extraído DNA total de amostras de folha de plantas selvagens e plantas transgênicas. Para tal, coletaram-se cerca de 50 – 150 mg de folha, que foram transferidos rapidamente para um almofariz contendo nitrogênio líquido. Após evaporação no nitrogênio, o material foi pulverizado até obter um pó bastante fino, ao qual acrescentaram-se 3 mL de tampão de extração. Imediatamente a solução foi transferida para tubos plásticos estéreis de 1,5 mL, os quais foram mantidos em banho-maria a 65°C, por 30 minutos, com agitação suave a cada 10 minutos.

Logo depois, foram adicionados aos tubos 10 microlitros de Proteinase K e os mesmos foram incubados novamente em banho-maria a 65°C por 30 minutos, com agitação suave a cada 10 mim. Em seguida, os tubos foram centrifugados numa microcentrífuga a 10.000 rpm durante

10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL e, após atingir a temperatura ambiente, foi feita a primeira extração de DNA utilizando-se fenol-clorofórmio (1:1), na proporção de 1:1 (1 parte do sobrenadante: 1 parte de fenol-clorofórmio).

Em seqüência, o tubo foi invertido suavemente por várias vezes para conseguir uma emulsão homogênea e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. Imediatamente após os tubos serem retirados cuidadosamente da microcentrífuga, a fase superior (aquosa) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, evitando-se os contaminantes da fase inferior. Logo em seguida foi adicionada RNase 100 mg/mL (1:100) e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Na última fase da extração foi adicionado o mesmo volume da solução de clorofil (24 partes de clorofórmio: 1 parte de álcool isoamílico) e a mistura foi colocada sob agitação suave por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos e a fase superior foi transferida para um novo recipiente.

Finalmente, adicionou-se o mesmo volume da solução de clorofil e a mistura foi agitada suavemente. Em seguida, centrifugaram-se os tubos a 10.000 rpm durante 10 minutos e a fase superior foi transferida para um novo tubo. A essa fase aquosa superior, adicionou-se 1 volume de álcool isopropílico e a solução foi, então, homogeneizada até a formação de um precipitado de DNA. O DNA precipitado foi lavado no próprio tubo em álcool 70%, por três vezes e foram adicionados 100 µL de água ultra pura. O DNA genômico foi armazenado a 4°C.

A presença de SEQ ID NO: 1 no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de tabaco foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Inicialmente foram utilizados 1µL de DNA, 1,5µL 4 dNTP (10mM), 1,4µL MgCl₂ (25mM), 1µL de Primer sense (10µM), 1µL Primer antisense (10µM), 2,5µL Tampão Taq 10x, 0,3µL Taq Polimerase (Fermentas), 16,3µL de água MilliQ e essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 3 minutos à 94°C mais 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos a uma temperatura de 54°C, 2 minutos a 72°C e 7 minutos a 72°C.

O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. Dentre 12 amostras de plantas supostamente transgênicas, a presença da SEQ ID NO:1 foi confirmada em 8. Essas plantas foram utilizadas nos ensaios posteriores para observar os efeitos do gene *Scdr1* indicado na SEQ ID NO:1 nas características das plantas de tabaco.

Exemplo 5: ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1 SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO

Para determinar os efeitos do estresse hídrico sobre a germinação foram utilizadas sementes de plantas de tabaco do tipo selvagem e de plantas transgênicas identificadas no Exemplo 4.

As sementes foram esterilizadas superficialmente com álcool 70% por 1 min, incubadas em NaClO 2% por 30 min e lavadas por cinco a seis vezes em água destilada estéril. As sementes foram semeadas em placas de Petri (30 sementes por placa) contendo meio Murashige-Skoog (MS) sólido, pH 5,8, em uma câmara a 23°C com fotoperíodo 16 / 8 h luz/escuro (300-400 mmol fótons m⁻² s⁻¹).

Então, as sementes que foram transformadas em três eventos independentes (*Scdr1*-1, *Scdr1*-2 e *Scdr1*-3), foram utilizadas para avaliar a porcentagem de germinação em meio de cultura contendo manitol verificando-se a resposta ao estresse hídrico. Para testar o efeito da seca foi utilizado manitol no meio de cultura nas concentrações de 0, 200, 300 e 400 mM. O número de sementes germinadas foi observado diariamente durante 15 dias e a germinação foi definida como o surgimento do hipocótilo.

Na condição controle sem manitol, sementes de plantas selvagens e plantas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram similar porcentagem de germinação (Figura 2A). O estresse hídrico inibe ou reduz a germinação em plantas de tabaco. No meio contendo 200 mM manitol as sementes das plantas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram porcentagem de germinação reduzida comparada com as sementes selvagens (Figura 2B). Em condições de estresse hídrico mais alto (300 mM), a germinação de plantas transgênicas e selvagens foi fortemente reduzida

(Figura 2C) e completamente inibida em 400 mM de manitol. Portanto, as plantas com o gene *Scdr1* indicado em SEQ ID NO: 1 apresentaram maior nível de tolerância ao estresse hídrico.

Em numerosas plantas cultivadas, a germinação e o crescimento inicial de plântulas são as fases mais sensíveis a estresses abióticos. Por exemplo, alguns fatores ambientais, como baixas temperaturas, altas concentrações de sal ou de déficit hídrico no meio retardam significativamente a germinação e reduzem a taxa de eventos germinativos. A baixa taxa de germinação de sementes pode resultar no estabelecimento irregular no solo, e redução da produtividade. Uma característica da planta desejável para a produção de cultivares comerciais em condições de campo é a habilidade da semente para germinar rapidamente e de forma homogênea sob condições de estresse.

As plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 germinaram mais de 20% em altas concentrações de estresse, enquanto que as sementes selvagens foram completamente inibidas. O desempenho de sementes transgênicas de tabaco carregando o gene de interesse foi melhor do que plantas selvagens em condições de estresse hídrico, indicando que o gene de estudo desempenha um papel protetor nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta.

Exemplo 6: ANÁLISE DA GERMINAÇÃO SOB ESTRESSE SALINO

Para determinar os efeitos do estresse hídrico salino sobre a germinação foram utilizados sementes de plantas transgênicas de tabaco do tipo selvagem e transgênicas, identificadas no exemplo 4.

As sementes foram esterilizadas superficialmente com álcool 70% por 1 min, incubadas em NaClO 2% por 30 min e lavadas cinco a seis vezes em água destilada estéril. As sementes foram semeadas em placas de Petri (30 sementes por placa) contendo meio Murashige-Skoog (MS) sólido, pH 5,8, em uma câmara a 23°C com fotoperíodo 16/8 h luz/escuro (300-400 mmol fótons m⁻² s⁻¹) e para testar o efeito do estresse salino foi utilizado NaCl (0, 100, 175 mM) no meio de cultura. O número de sementes germinadas foi observado diariamente durante 15 dias, sendo a germinação foi definida como o surgimento do hipocótilo.

Quando as sementes foram plaqueadas em 100 mM NaCl não se encontraram diferenças entre as plantas transgênicas e não transgênicas (Figura 2D). No entanto, utilizando-se uma concentração de estresse mais severo (175 mM NaCl), a germinação foi totalmente inibida em sementes selvagens, mas só moderadamente nas plantas contendo SEQ ID NO: 1, as quais atingiram 50% de germinação (Figure 3E). Os resultados demonstram que o gene *Scdr1*, indicado na SEQ ID NO:1 em plantas transgênicas, melhora a germinação sob estresse salino.

Diferentes respostas a estresses abióticos são o resultado de interações cooperativas entre os vários componentes bioquímicos, fisiológicos e de caracteres morfológicos. Essas interações podem variar entre espécies e mesmo variedades, como observado para o estresse hídrico. Plantas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram alta nível de tolerância ao estresse salino.

Como mencionado anteriormente, a germinação e o crescimento da plântula são fases muito sensíveis às condições estressantes. Por sua vez, a salinidade dos solos é um problema global, que não só impede o uso de grandes áreas para a agricultura, mas também pode reduzir a produtividade em certas áreas agrícolas, em decorrência do aumento salino ocorrido devido à irrigação com água inapropriada por apresentar elevado conteúdo de sais.

Em condições de alta salinidade, enquanto as plantas selvagens apresentaram total inibição da germinação, as plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram 50% de germinação. Conseqüentemente, esta invenção mostra que a SEQ ID NO: 1 é útil para a produção de plantas geneticamente modificadas com maior tolerância à salinidade.

Exemplo 7: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1 SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO.

Para avaliar a resposta ao estresse hídrico, plantas selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram germinadas durante 16 dias e logo transferidas para potes contendo Plantmax HT (Eucatex, Brasil) em câmara de crescimento, a 22°C e com 18 horas de luz. As plantas foram irrigadas diariamente com 70 ml de água por 4 semanas antes de começar o estresse.

Para o estresse hídrico utilizaram-se cinco plantas por tratamento e por genótipo (selvagem e transgênico), as quais foram irrigadas com 70 ml de manitol 200 mM por 10 dias e depois foram irrigadas novamente com água por três dias, como descrito por Zhang *et al.* (Zhang XX, Liu SK, Takano T (2008) Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Molecular Biology* 68: 131-143).

Para estimar a condutância estomática de CO₂ (gs), taxa de transpiração (E), fotossíntese (A) e concentração interna de CO₂ (Ci), sob condições controle e sob estresse hídrico, foram utilizadas folhas completamente expandidas na mesma posição das plantas de tabaco.

Avaliaram-se três eventos independentes de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 e plantas selvagens. As medições foram realizadas com equipamento IRGA (LCpro+; ADC bioscientific, Reino Unido), numa concentração de CO₂ de 360 µL L⁻¹, intensidade de luz de 1000 µmol m⁻² s⁻¹, fluxo de gás 200 mL min⁻¹ e temperatura dentro da câmara de 25°C (Guo Q, Zhang J, Gao Q, Xing S, Li F, et al. (2008) Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* 165: 1745-1755).

Todas as variáveis fisiológicas analisadas foram negativamente afetadas pelo estresse hídrico, tanto nas plantas selvagens como nas plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1. No entanto, as plantas transgênicas apresentaram melhor desempenho nas análises fisiológicas realizadas. A taxa de fotossíntese (A) nas plantas transgênicas contendo SEQ ID NO: 1, submetidas a estresse hídrico, apresentou uma rápida recuperação quando as plantas foram reidratadas durante 3 dias, ao contrario das plantas selvagens que não conseguiram recuperá-la (dia 13 na Figura 3B).

Da mesma forma, tanto gs (Figura 3H) como E (Figura 3K) foram rapidamente recuperadas durante a reidratação após o estresse hídrico. Ci mostrou valores similares sob condições normais, enquanto que sob condições de estresse as plantas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram melhor desempenho que as plantas selvagens (Figura 3E). Em resumo, foi observada uma clara diferença entre plantas transgênicas e selvagens em todos os parâmetros fotossintéticos avaliados em condições de seca.

As culturas agrícolas usualmente experimentam escassez de água em algum momento ao longo do seu ciclo de vida e, dependendo da duração e intensidade do estresse hídrico, podem ocorrer perdas expressivas na produtividade. Parâmetros importantes da fisiologia das plantas quando submetidas a estresse hídrico foram menos afetados naquelas que continham a SEQ ID NO: 1, comparativamente às plantas selvagens. Isto indica que a presente invenção contribui para a produção de plantas geneticamente modificadas com melhor performance em condições de escassez de água.

Exemplo 8: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1 SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO

10 Para avaliar o efeito da SEQ ID NO: 1 em condições de estresse salino, plantas selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram germinadas durante 16 dias e logo transferidas para potes contendo Plantmax HT (Eucatex, Brasil) em câmara de crescimento a 22°C e 18 horas de luz. As plantas foram irrigadas diariamente com 70 ml de água por 4 semanas antes de começar o estresse.

15 Para avaliar o efeito do estresse salino, plantas transgênicas e selvagens foram regularmente irrigadas com água por cinco semanas (tratamento controle), enquanto um grupo de plantas foi irrigado com 150 mM NaCl por 10 dias e posteriormente foram reidratadas por três dias com água (nas plantas controle foi mantida a irrigação durante o tempo do experimento).

20 Três eventos independentes de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram avaliados em termos de condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E), fotossíntese (A), e concentração interna de CO₂ (Ci), sob condições controle e sob estresse salino.

A avaliação da taxa de fotossíntese (A) em plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foi reduzida em resposta ao estresse salino, apresentando uma rápida recuperação quando as plantas foram reidratadas durante três dias, enquanto que as plantas selvagens não apresentaram essa recuperação (Figura 3C). Por sua vez, tanto gs, (Figura 3I) como E (Figura 3L) foram rapidamente recuperados durante a reidratação após o estresse salino. Ci mostrou

similares valores sob condições normais, embora sob condições de estresse as plantas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram melhor desempenho que as plantas selvagens (Figura 3F).

Em resumo, foi observada que as plantas contendo a SEQ ID NO: 1 apresentaram melhor performance que as plantas selvagens em todos os parâmetros fotossintéticos avaliados durante o estresse salino.

Exemplo 9: AVALIAÇÃO DO TEOR RELATIVO DE ÁGUA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1 SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO.

Sementes de tabaco selvagens e transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram germinadas por 16 dias em placas de Petri contendo meio MS e pH 5,8. As plântulas foram então transferidas para vasos de 500 ml contendo Plantmax HT (Eucatex, Brasil) durante 3 semanas mantidos em uma câmara de crescimento a 23 °C com fotoperíodo 16/8 h luz/escuro e adubadas semanalmente com solução nutritiva (EPPQ, Brasil). Cada planta foi irrigada com 70 ml de uma solução de 200 mM de manitol por 10 dias e, em seguida, irrigada por três dias com água pura para a recuperação.

Para estimar-se o teor de água na folha, amostras de plantas foram incubadas a 80 °C por 24 horas para avaliar o seu peso seco. O teor de água na Folha foi calculado como $100 \times (FW - DW) / (FW)$, sendo FW a massa fresca e DW o peso seco. Sob estresse hídrico o conteúdo de água nas folhas foi reduzido drasticamente nas plantas selvagens (Figura 4). Em contraste, plantas transgênicas contendo SEQ ID NO: 1 foram capazes de manter quase inalterado seu conteúdo de água, indicando que a SEQ ID NO: 1 confere uma capacidade maior de manutenção da turgência sob condições de estresse hídrico.

Exemplo 10: AVALIAÇÃO DO TEOR RELATIVO DE ÁGUA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1 SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO.

Sementes de tabaco selvagens e transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram germinadas por 16 dias em placas de Petri contendo meio MS e pH 5,8. As plântulas foram transferidas para vasos de 500 ml contendo Plantmax HT (Eucatex, Brasil) durante 3 semanas e mantidas em

câmara de crescimento a 23 °C com fotoperíodo 16/8 h luz/escuro, sendo adubadas semanalmente com solução nutritiva (EPPQ, Brasil). Cada planta foi irrigada com 70 ml de uma solução de 175 mM de NaCl por 10 dias e, em seguida, irrigada por três dias com água pura para a recuperação.

- 5 Para estimar o teor de água na folha, amostras de plantas foram incubadas a 80 °C por 24 horas para avaliar o seu peso seco. O teor de água na folha foi calculado como $100 \times (FW - DW) / (FW)$, sendo FW a massa fresca e DW o peso seco.

10 O estresse salino diminuiu o conteúdo de água nas plantas selvagens, enquanto que as plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram capazes de manter quase inalterado o conteúdo de água na folha (Figura 4), indicando que as plantas que superexpressam *Scdr1* são capazes de manter a turgência sob condições de estresse.

Exemplo 11: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SEQ ID NO: 1 NA MASSA SECA DE PLANTAS SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO.

15 Plantas de tabaco selvagens e plantas transgênicas contendo SEQ ID NO: 1 foram germinadas durante 16 dias e logo transferidas para recipientes contendo Plantmax HT (Eucatex, Brazil). As plantas foram depositadas numa câmara de crescimento a 22°C com 18 horas de luz e irrigadas diariamente com 70 ml de água por 4 semanas antes de começar o estresse. Para o estresse hídrico as plântulas foram irrigadas com 70 ml de manitol 200 mM, por 10 dias, e depois foram irrigadas novamente com água por três dias, como descrito por Zhang *et al.* (**Zhang XX, Liu SK, Takano T (2008) Two cysteine proteinase inhibitors from Arabidopsis thaliana, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Molecular Biology 68: 131-143).**)

25 Amostras das plantas foram coletadas e mantidas a 80 °C por 24 horas para avaliação da massa seca nas raízes e na parte aérea, como descrito por Guo *et al.* (**Guo Q, Zhang J, Gao Q, Xing S, Li F, et al. (2008) Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology 165: 1745-1755).**)

Observou-se uma redução na massa das plantas selvagens e transgênicas quando submetidas à seca, comparativamente às do tratamento controle. No entanto, ao final do tratamento de estresse hídrico, as plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1 apresentaram mais massa seca que as plantas selvagens (Figura 5).

5 Exemplo 12: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SEQ ID NO: 1 NA MASSA SECA DE PLANTAS SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO.

Plantas de tabaco selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 foram germinadas durante 16 dias e logo transferidas para potes contendo Plantmax HT (Eucatex, Brazil), permaneceram localizadas numa câmara de crescimento a 22°C com 18 horas de luz e
10 foram irrigadas diariamente com 70 ml de água por 4 semanas antes de começar o estresse. Para o estresse salino as plantas foram irrigadas com 70 ml de NaCl 175 mM, por 10 dias, e depois foram irrigadas novamente com água por três dias, como descrito por Zhang *et al.* (**Zhang XX, Liu SK, Takano T (2008) Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Molecular Biology 68: 131-143**).
15

Amostras das plantas transformadas foram coletadas e mantidas a 80 °C por 24 horas para avaliação da massa seca nas raízes e na parte aérea, como descrito por Guo *et al.* (**Guo Q, Zhang J, Gao Q, Xing S, Li F, et al. (2008) Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology 165: 1745-1755**).

20 Observou-se que o estresse salino reduz a massa seca de plantas selvagens e transgênicas. No entanto, a presença da SEQ ID NO: 1 nas plantas transgênicas associou-se à uma maior capacidade de acumulação de matéria seca em condições de estresse salino (Figura 5).

Exemplo 13: INSPEÇÃO VISUAL DO EFEITO DOS ESTRESSE HÍDRICO E SALINO EM PLANTAS DE TABACO SELVAGEM E EM PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1.

25 Para avaliar a resposta aos estresses hídrico e salino, plantas selvagens e plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1 foram germinadas durante 16 dias e logo transferidas para potes contendo Plantmax HT (Eucatex, Brasil) em câmara de crescimento a 22°C com 18 horas

de luz e irrigadas diariamente com 70 ml de água por 4 semanas antes de começar o estresse. Para avaliar o efeito do estresse hídrico as plântulas foram irrigadas com 70 ml de manitol 200 mM por 10 dias e depois foram irrigadas novamente com água por três dias, como descrito por Zhang *et al.* (Zhang XX, Liu SK, Takano T (2008) **Two cysteine proteinase inhibitors from**
5 **Arabidopsis thaliana, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Molecular Biology 68: 131-143**) e para avaliar o efeito do estresse salino as plantas foram irrigadas com 150 mM NaCl por 10 dias e posteriormente foram reidratadas por três dias com água. No tratamento controle as plantas foram irrigadas durante o tempo do experimento.

10 Em condições controle, todas as plantas tiveram resultados semelhantes (figura 6), enquanto sob estresse hídrico e salino as folhas das plantas selvagens apresentaram murchas. Por sua vez, as plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 exibiram um fenótipo praticamente similar às plantas mantidas sem estresse (figura 6).

15 Essas mesmas plantas foram usadas nas análises mostradas nos exemplos 7 e 8 e estão em concordância com a melhor performance das plantas em quanto ao parâmetros fotossintéticos. Da mesma forma, esse fenótipo observado na Figura 6 também é um reflexo dos maiores teores de água mostrados nos exemplos 9 e 10, bem como com a maior massa seca mostrada nos exemplos 11 e 12.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de plantas geneticamente modificadas com tolerância à estresses ambientais, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) Produção de um vetor que compreenda a sequência descrita em SEQ ID NO:1;

5 b) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas distinto do promotor naturalmente encontrado no genoma da cana à montante da sequência correspondente à SEQ ID NO:1;

10 c) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas distinto daquele encontrado naturalmente no genoma da cana à jusante da SEQ ID NO:1;

15 d) Inserção do dito vetor compreendendo a sequência descrita em SEQ ID NO:1, o promotor distinto do promotor naturalmente encontrado no genoma da cana à montante da sequência correspondente à SEQ ID NO:1 e o terminador distinto daquele encontrado naturalmente no genoma da cana à jusante da SEQ ID NO:1 no genoma de célula vegetal, planta ou partes de plantas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** plantas geneticamente modificadas com tolerância à estresses ambientais apresentarem no seu genoma a sequência gênica SEQ ID NO:1.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** sequência gênica SEQ ID NO:1 ser obtida de cana-de-açúcar.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledôneas.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** poder ser aplicado em dicotiledôneas.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser aplicado em tabaco.
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser aplicado em cana-de-açúcar, soja, milho, arroz e trigo.
8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** permitir a integração do vetor
5 no genoma da célula vegetal.
9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** modular a tolerância da planta a estresses ambientais.
10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** estresse ambiental ser preferencialmente seca.
- 10 11. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** estresse ambiental ser preferencialmente salinidade.
12. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 11 **caracterizado por** ser aplicado para produção de célula vegetal, planta ou partes de planta que proporcione tolerância à estresses ambientais.
- 15 13. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 11 **caracterizado por** ser aplicado para produção de sementes a partir de plantas com tolerância à estresses ambientais e que contenham a sequência descrita em SEQ ID NO:1.
14. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 11 **caracterizado por** ser aplicado para produção de partes de plantas usadas com a finalidade de reprodução assexuada a partir de
20 plantas que contém a sequência descrita em SEQ ID NO:1.
15. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 11 **caracterizado por** ser aplicado para produção de progênie de plantas que contém a sequência descrita em SEQ ID NO:1.
16. Uso de um vetor contendo a sequência gênica descrita em SEQ ID NO:1 **caracterizado por** ter a finalidade de produção de plantas transgênicas com tolerância a estresses ambientais

17. Uso da sequência gênica descrita em SEQ ID NO: 1 **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledôneas ou dicotiledôneas com a finalidade de produção de plantas com tolerância a estresses ambientais.

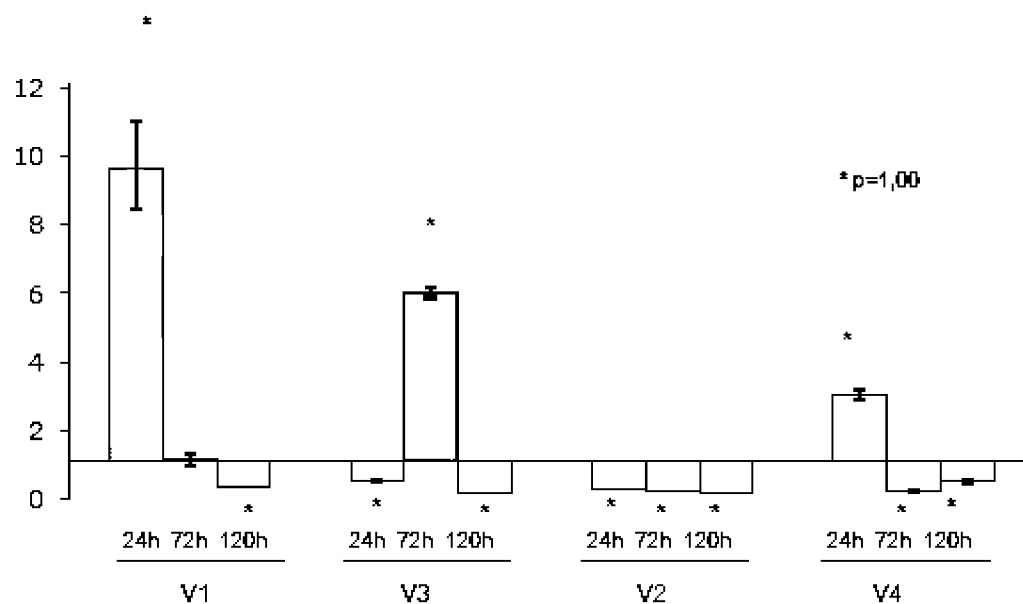


Figura 1

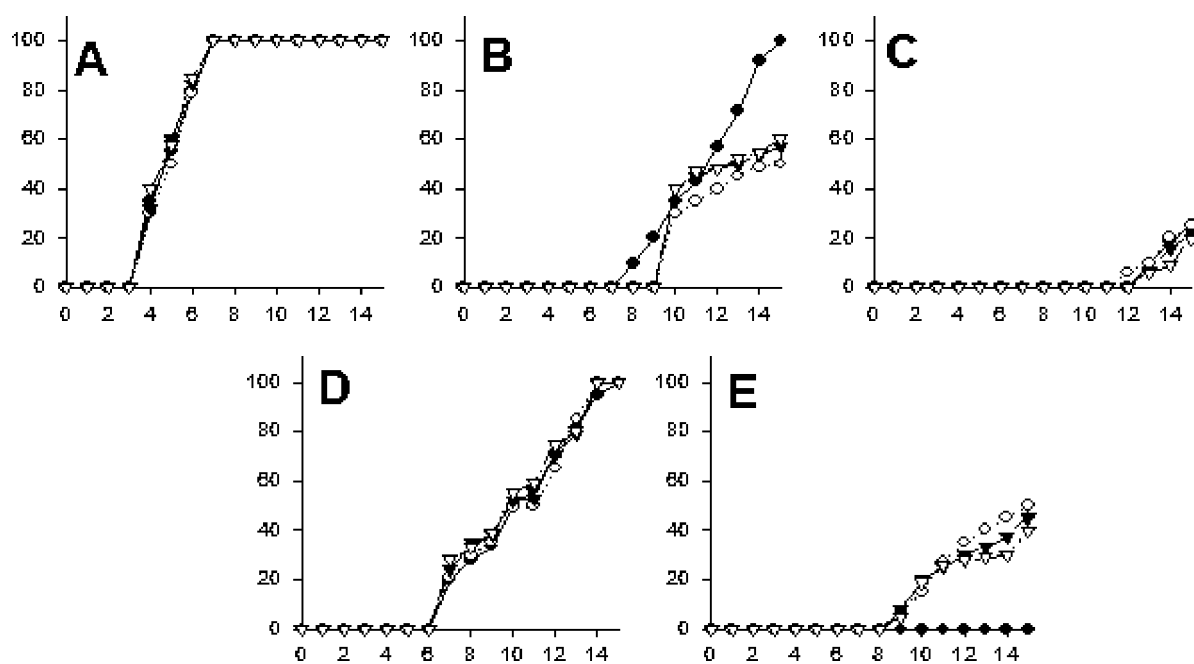


Figura 2

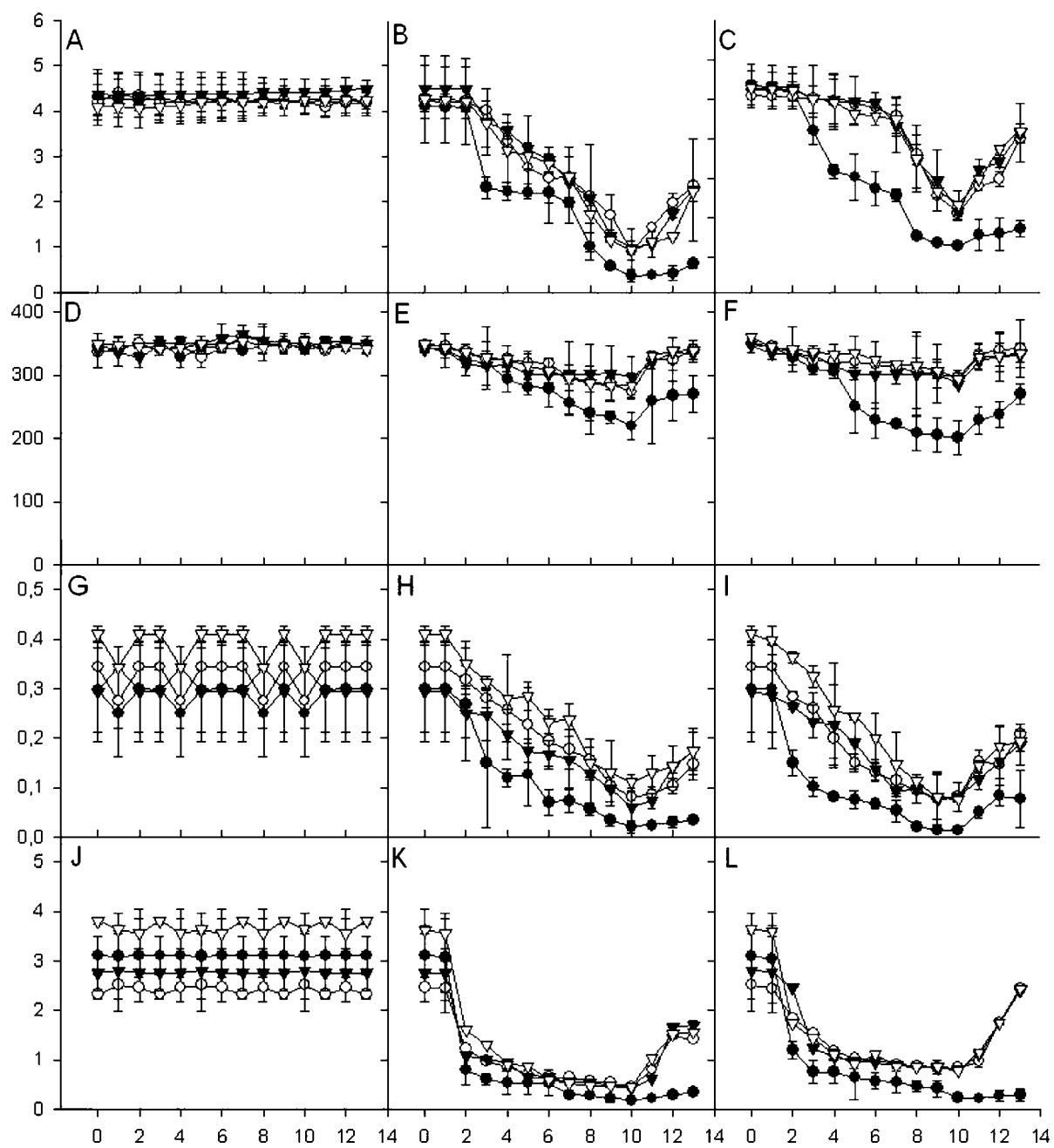


Figura 3

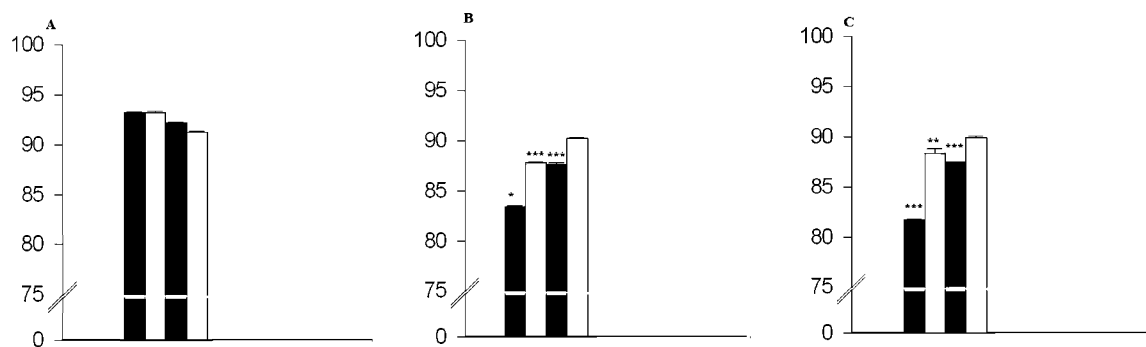


Figura 4

5

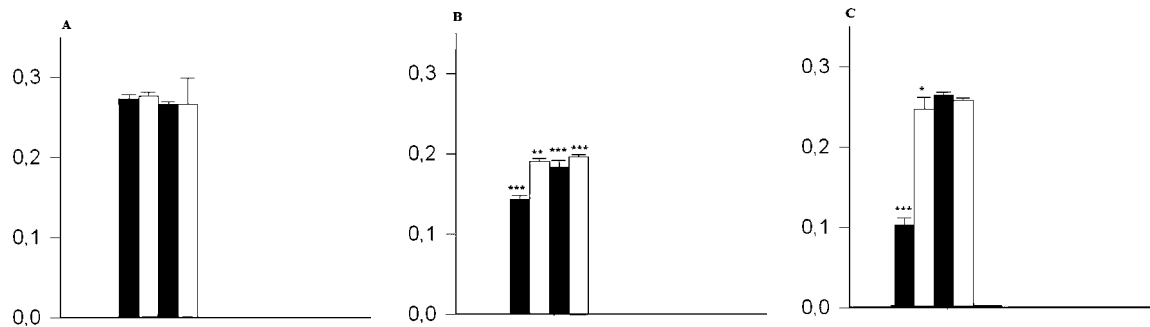
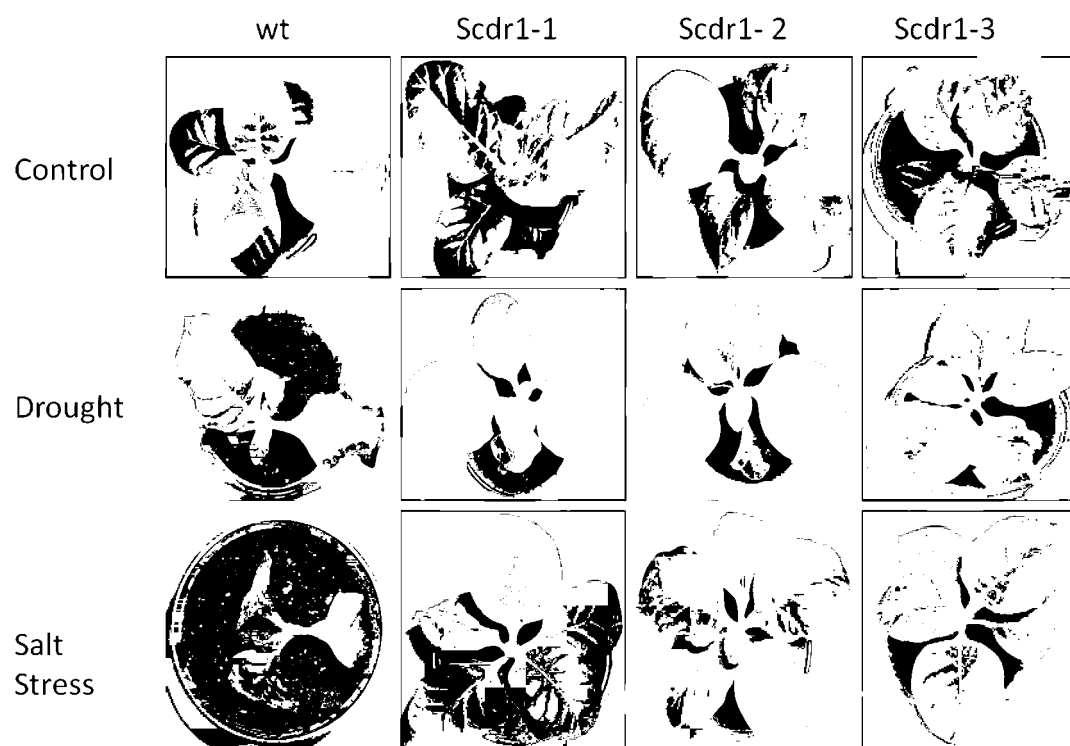


Figura 5

**Figura 6**