



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

(21) **PI 0710192-9 A2**

(22) Data de Depósito: 03/04/2007
(43) Data da Publicação: 29/05/2012
(RPI 2160)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/415
C12N 15/82
A01H 5/00

(54) **Título:** ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE DE PLANTA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA

(30) **Prioridade Unionista:** 13/04/2006 US 60/744750

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

(72) **Inventor(es):** Amber Shirley, Bryan Mckersie, Damian Allen, Lori V. Mills, Nocha Van Thielen, Ruoying Chen

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007053219 de 03/04/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/118790 de 25/10/2007

(57) **Resumo:** ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE DE PLANTA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA. Uma planta transgênica transformada por um ácido nucleico codificando Polipeptídeo Relacionado com Estresse (SRP), em que a expressão da sequência de ácido nucleico da planta resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância a estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta. - São também fornecidos produtos agrícolas, incluindo sementes, produzidos pelas plantas transgênicas. São também fornecidos SRPs isolados e ácido nucleico isolado codificando os SRPs, e vetores e células hospedeiras contendo os últimos.

“ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE DE PLANTA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

5 Campo da Invenção

Esta invenção refere-se genericamente a seqüências de ácido nucleico codificando polipeptídeos que são associados com o aumentado crescimento das plantas. Em particular, esta invenção refere-se a seqüências de ácido nucleico codificando polipeptídeos que conferem à uma planta
10 aumentado crescimento sob condições normais ou de estresse abiótico e/ou aumentada tolerância sob condições de estresse abiótico.

Fundamentos da Invenção

Os estresses ambientais abióticos, tais como estresse por seca, estresse por salinidade, estresse por calor e estresse por frio, são os fatores
15 limitantes principais do crescimento da planta e produtividade. As perdas de culturas e perdas de produção de culturas das culturas principais, tais como soja, arroz, milho, algodão e trigo, causadas por estes estresses representam um significativo fator econômico e político e contribuem para escassez de alimentos em muitos países subdesenvolvidos.

20 As plantas são tipicamente expostas durante seu ciclo de vida a condições de reduzido teor de água ambiental. A maioria das plantas desenvolveram estratégias para protegerem-se contra estas condições de dessecação. Entretanto, se a severidade e duração das condições de estiagem forem demasiado grandes, os efeitos sobre o desenvolvimento, crescimento e
25 produção da maioria das plantas de cultura são profundos. Exposição contínua às condições de estiagem provoca maiores alterações no metabolismo das plantas, o que finalmente resulta em morte celular e, conseqüentemente, perdas de produção.

Desenvolver plantas tolerantes ao estresse é uma estratégia que

tem o potencial de resolver ou mediar pelo menos alguns destes problemas. Entretanto, as estratégias de reprodução de plantas tradicionais para desenvolver novas linhagens de plantas que exibam resistência (tolerância) a estes tipos de estresses são relativamente lentas e requerem linhagens resistentes específicas para cruzar com a linhagem desejada. Os recursos do idioplasma limitados para tolerância a estresse e a incompatibilidade em cruzamentos entre espécies de plantas distantemente aparentadas representam problemas significativos encontrados na reprodução convencional. Adicionalmente, os processos celulares resultando em tolerância à estiagem, frio e sal em plantas modelo tolerantes à seca, frio e/ou sal são complexos por natureza e envolvem múltiplos mecanismos de adaptação celular e numerosos trajetos metabólicos. Esta natureza de multicomponentes de tolerância a estresse não somente tornou a reprodução quanto à tolerância grandemente má sucedida como também limitou a capacidade de geneticamente construir plantas tolerantes ao estresse, empregando-se métodos biotecnológicos.

Os estresses à estiagem, estresses por calor, estresses por frio e estresses por sal têm um tema comum importante para crescimento das plantas e que é a disponibilidade de água. Como examinado acima, a maioria das plantas desenvolveram estratégias para protegerem-se contra estas condições de dessecação, entretanto, se a severidade e duração das condições das condições de estiagem forem demasiado grandes, os efeitos sobre o desenvolvimento, crescimento e produção das plantas da maioria das plantas de cultura são profundos. Além disso, a maioria das plantas de cultura são muito susceptíveis a mais elevadas concentrações de sal no solo. Em razão de elevado teor de sal em alguns solos resultar em menos água sendo disponível para a ingestão celular, elevada concentração de sal tem um efeito sobre as plantas similar ao efeito da seca sobre as plantas. Adicionalmente, sob temperaturas de congelamento, as células das plantas perdem água como resultado da formação de gelo que começa no apoplasto e retira água do

simplasto. Um mecanismo de resposta molecular da planta a cada uma destas condições de estresse é comum e os transportadores de íons representam papel essencial nestes mecanismos moleculares.

A avaria comum de diferentes estresses, tais como estresse de seca, salinidade parece ser na maior parte devida à desidratação (Smirnov, 1998, Curr. Opin. Biotech. 9:214-219). As plantas tolerantes e sensíveis (estresse de água) à estiagem podem ser claramente distinguidas pelo acúmulo dramático de íons e solutos em plantas tolerantes, que resulta em ajustamentos osmóticos (Bohnert and Jensen, 1996, TIBTECH 14:89-97). As condições de seca e elevado sal podem interagir com a nutrição mineral em numerosas maneiras, como consequência de (1) reduzido transporte de íons através do solo para as raízes; e/ou (2) absorção modificada de íons pelas raízes.

O potássio é um principal macronutriente das plantas e o cátion potássio é o cátion mais abundante nas plantas. O movimento e transporte de potássio é importante para o crescimento, desenvolvimento, osmorregulação e homeostase das plantas. Os transportadores de transporte das plantas foram identificados como pertencentes a diversas famílias, incluindo a família HAK. A família HAK contém membros com homologia com os transportadores de potássio primeiro identificados em *Escherichia coli* e *Schwanniomyces occidentalis*. Estes transportadores de potássio de HAK são encontrados como grandes famílias de gene de Arabidopsis (Maeser et al., 2001) e em (Banuelos et al., 2002). Os perfis de hidrofobicidade desta classe HAK de transportadores de potássio sugerem que estas proteínas possuem 12 domínios de transmembrane e uma longa alça citosólica. Alguns membros desta família têm demonstrado funcionar como transportadores de cátion de potássio de baixa afinidade (Quintero et al., 1997), enquanto em outros organismos o transportador de cátion de potássio tem demonstrado funcionar como um transportador de alta afinidade (Rubio et al., 2000).

O potássio é particularmente importante em plantas não somente como um nutriente, mas também como um osmótico. O potássio pode fazer uma contribuição de 30 – 50 % para o potencial de água, particularmente em tecidos de folhas mais velhas (Munns et al., 1979, Aust. J. Plant Physiol. 6:379-389). Após prolongada seca no campo, o potássio acumula-se nas folhas de azevém e cevada e poderiam ter um papel no ajustamento osmótico. Além disso, o potássio representa um papel chave na abertura dos estomas. Em razão de o potássio ser perdido das células de proteção (Ehret and Boyer, 1979, J. Exper. Bot. 30:225-234), um suprimento reduzido de potássio reduz a condutância estomatal para CO₂ muito mais do que reduz a condutância interna (Terry and Ulrich, 1973, Plant Physiol. 51:783-786).

As raízes das plantas podem absorver potássio acima de mais do que uma faixa de concentração de 1000-vezes e a dependência de concentração da absorção de potássio pelas raízes tem cinética complexa, sugerindo a presença de múltiplos sistemas de absorção de potássio. As famílias de genes codificando canais de K⁺ retificando para dentro têm sido identificadas em diversas espécies de plantas. O gene do canal AKT1 K⁺ é predominantemente expresso em raízes e análise genética indica que o canal AKT1 medeia a absorção de K⁺ nas faixas tanto micromolar como milimolar (Hirsch et al., 1998, Science 280:918-921). Os transportadores ativos também participam da absorção de K⁺ e diversos genes candidatos codificando os transportadores energizados têm sido identificados (Hirsch and Sussman, 1999, TIBTECH 17:356-361).

A biomassa das plantas é produção para culturas de forragem como alfafa, milho de silagem e feno. Muitos substitutos para produção têm sido usados em culturas de grãos. Principais entre estes são estimativas de tamanho de plantas. O tamanho das plantas pode ser medido de muitos modos, dependendo da espécie e estágio de desenvolvimento, porém inclui

peso seco total da planta, peso seco acima do solo, peso fresco acima do solo, área de folha, volume de caule, altura da planta, diâmetro da roseta, comprimento da folha, comprimento da raiz, massa da raiz, número de rebentos e número de folhas. Muitas espécies mantêm uma relação conservativa entre o tamanho de diferentes partes da planta em um dado estágio de desenvolvimento. Estas relações alométricas são usadas para extrapolar de uma destas medidas de tamanho para outra (e.g. TITTONELL et al 2005 *Agric Ecosys & Environ* 105: 213). O tamanho da planta em estágio de desenvolvimento tipicamente correlacionar-se-á com o tamanho da planta mais tarde no desenvolvimento. Uma planta maior com uma área de folha maior pode tipicamente absorver mais luz e bióxido de carbono do que uma planta menor e, portanto, igualmente ganhará um maior peso durante o mesmo período (FASOULA & TOLLENAAR 2005 *Maydica* 50:39). Isto é além da continuação potencial da vantagem microambiental ou genética que a planta tinha para conseguir o tamanho maior inicialmente. Há um forte componente genético para a taxa de tamanho e crescimento da planta (e.g. ter STEEGER et al 2005 *Plant Physiology* 139:1078), e assim para uma faixa de diversos genótipos, o tamanho da planta sob uma condição ambiental é provável correlacionar-se com o tamanho sob outra (HITTALMANI et al 2003 *Theoretical Applied Genetics* 107:679). Desta maneira, um ambiente padrão é usado como um substituto para os diversos ambientes dinâmicos encontrados em diferentes locais e tempos pelas culturas no campo.

O índice de colheita, a relação de produção de semente para peso seco acima do solo, é relativamente estável sob muitas condições ambientais e assim uma correlação robusta entre o tamanho da planta e a produção de grãos pode, com frequência, ser obtida (p. ex., REBETZKE et al 2002 *Crop Science* 42:739). Estes processos são intrinsecamente ligados porque a maior parte da biomassa de grãos é dependente da produtividade fotossintética atual ou armazenada pelas folhas e caule da planta (GARDENER et

al 1985 *Physiology of Crop Plants*. Iowa State University Press, pp 68-73). Portanto, a seleção do tamanho da planta, mesmo em estágios iniciais de desenvolvimento, tem sido usado como um indicador para futura produção potencial (p. ex., Tittone et al 2005 *Agric Ecosys & Environ* 105: 213).

5 Quando testando o impacto das diferenças genéticas sobre a tolerância ao estresse, a capacidade de padronizar as propriedades do solo, temperatura, água e disponibilidade de nutrientes e intensidade da luz é uma vantagem intrínseca dos ambientes de estufa ou de câmara de crescimento de plantas, em comparação com o campo. Entretanto, limitações artificiais sobre a
10 produção devidas a fraca polinização devida à ausência de vento ou insetos, ou insuficiente espaço para maturar a raiz ou crescimento das coberturas, podem limitar o uso destes ambientes controlados para testar diferenças de produção. Portanto, as medições do tamanho da planta no desenvolvimento inicial, sob condições padronizadas de uma câmara ou estufa de crescimento,
15 são práticas padrão para fornecer indicação de vantagens de produção genéticas potenciais.

Há uma substitutibilidade fundamental fisioquimicamente forçada em todos os organismos terrestres fotossintéticos, entre absorção de bióxido de carbono (CO_2) e perda de água (Taiz and Zeiger, 1991, *Plant*
20 *Physiology*, Benjamin/Cummings Publishing Co., p. 94). O CO_2 precisa ser em solução aquosa para a ação das enzimas de fixação de CO_2 , tais como Rubisco (Ribulose 1,5-bisfosfato Carboxilase/Oxygenase) and PEPC (Fosfoenolpiruvato carboxilase). Como uma superfície de célula úmida é necessária para difusão de CO_2 , evaporação inevitavelmente ocorrerá quando
25 a umidade for abaixo de 100% (Taiz and Zeiger, 1991, p. 257). As plantas têm numerosos mecanismos fisiológicos para reduzir a perda d'água (p. ex., cutículas cerosas, fechamento estomatal, pelos nas folhas, buracos estomatais afundados). Como estas barreiras não discriminam entre fluxo de água e CO_2 , estas medidas de conservação de água também atuarão para aumentar a

resistência à absorção de CO₂ (Kramer, 1983, Water Relations of Plants, Academic Press p. 305). A absorção de CO₂ fotossintética é absolutamente necessária para o crescimento das plantas e acúmulo da biomassa em plantas fotoautotróficas.

5 Eficiência de Uso da Água (WUE) é um parâmetro freqüentemente usado para estimar a substitutibilidade entre consumo de água e absorção/crescimento de CO₂ (Kramer, 1983, Water Relations of Plants, Academic Press p. 405). A WUE foi definida e medida de múltiplas maneiras. Uma abordagem é calcular a relação do peso seco total da planta para o peso
10 de água consumida pela planta por toda sua vida (Chu e al, 1991, Oecologia 89:580). Outra variação é utilizar um intervalo de tempo mais curto quando o acúmulo da biomassa e uso de água são medidos (Mian et al., 1998, Crop Sci. 38:390). Outra abordagem é utilizar as medições das partes restringidas da planta, por exemplo, medir-se somente o crescimento aéreo e o uso de água
15 (Nienhuis et al 1994 Amer J Bot 81:943). A WUE também foi definida como a relação de absorção de CO₂ para perda de vapor d'água de uma folha ou parte de uma folha, com freqüência medida durante um período de tempo muito curto (p. ex., segundos/minutos) (Kramer, 1983, p. 406). A relação de ¹³C/¹²C fixado no tecido da planta e medida com um espectrômetro de massa
20 de relação de isótopo também foi usado para estimar WUE em plantas utilizando fotossíntese C₃ (Martin et al., 1999, Crop Sci. 1775).

Um aumento da WUE é informativo acerca da eficiência relativamente melhorada do crescimento e consumo de água, porém esta informação tomada sozinha não indica se um destes dois processos mudou ou
25 ambos mudaram. Na seleção de traços para melhorar as culturas, um aumento da WUE devido a uma diminuição no uso de água, sem uma mudança do crescimento, teria mérito particular em um sistema agrícola irrigado, em que os custos de produção de água fossem elevados. Um aumento da WUE acionado principalmente por um aumento do crescimento sem um

correspondente aumento do uso de água teria aplicabilidade a todos os sistemas agrícolas. Em muitos sistemas agrícolas, em que o suprimento de água não é limitante, um aumento do crescimento, mesmo se ele viesse às custas do uso de água aumentado (isto é, nenhuma mudança da WUE), poderia também aumentar a produção. Portanto, novos métodos para aumentar tanto a WUE como o acúmulo de biomassa são necessários para melhorar a produtividade agrícola. Como a WUE integra muitos processos fisiológicos relativos ao metabolismo primário e uso de água, ela é tipicamente uma característica altamente poligênica com um grande genótipo por interação ambiental (Richards et al., 2002, Crop Sci. 42:111). Por estas e outras razões, algumas tentativas de selecionar mudanças de WUE em programas de reprodução tradicionais têm sido bem sucedidos.

Embora alguns genes que estão envolvidos em respostas ao estresse e uso de eficiência de uso de água em plantas tenham sido caracterizados, a caracterização e clonagem dos genes de planta, que conferem tolerância a estresse e eficiência de uso de água em plantas, permanecem grandemente incompletas e fragmentadas. Por exemplo, certos estudos indicaram que o estresse por seca e sal em algumas plantas pode ser devido aos efeitos genéticos aditivos, ao contrário de outra pesquisa que indica que genes específicos são transcricionalmente ativados em tecido vegetativo de plantas sob condições de estresse osmótico. Embora seja geralmente assumido que as proteínas induzidas por estresse tenham um papel na tolerância, evidência direta está ainda faltando e as funções de muitos genes responsivos a estresse são desconhecidas.

Há necessidade, portanto, de identificar genes adicionais expressos em plantas tolerantes a estresse e plantas que são eficientes no uso de água, que têm a capacidade de conferir tolerância ao estresse e/ou aumentada eficiência no uso de água à planta hospedeira e a outras espécies de plantas. AS plantas tolerantes a estresse e plantas com aumentada

eficiência ao uso de água recentemente geradas terão muitas vantagens, tais como uma aumentada faixa em que as plantas de cultura podem ser cultivadas, por exemplo, diminuindo-se as exigências de água de uma espécie de planta. Outras vantagens desejáveis incluem resistência aumentada a alojamento, a curvatura de rebentos ou caules em resposta ao vento, chuva, pestes ou doença.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção satisfaz, em parte, à necessidade de identificar novos genes únicos, capazes de conferir tolerância ao estresse e/ou aumentado crescimento sob condições normais ou de estresse às plantas na modificação da expressão dos genes. A presente invenção descreve um novo gênero de polipeptídeos relacionados com o estresse (SRPs) e SRP codificando ácidos nucleicos que são importantes para modular o crescimento e resposta da planta a um estresse ambiental. Mais particularmente, a modificação da expressão destes ácidos nucleicos codificando SRP em uma planta resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumentada tolerância a um estresse ambiental.

Portanto, a presente invenção inclui uma célula de planta isolada, compreendendo um ácido nucleico codificando SRP, em que a expressão da sequência de ácido nucleico na célula de planta resulta em aumentado crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou aumentada tolerância a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da célula de planta. Preferivelmente, o SRP é um Transportador de Canal de Potássio Ativo (AKT). Mais preferivelmente, o AKT é *Physcomitrella patens*, *Glycine max* ou *Triticum aestivum*. Isto é, são descritos aqui Transportadores de Canal de Potássio Ativos por *P. patens* (PpAKT-3), Transportadores de Potássio Ativos por *Glycine max* (GmAKT-2) e Transportador de Potássio Ativo por *Triticum aestivum* (TaAKT-1).

A invenção provê em algumas formas de realização que o SRP

e ácido nucleico codificante sejam aqueles que são encontrados em membros do gênero *Physcomitrella*, *Glycine* ou *Triticum*. Em outra forma de realização preferida, o ácido nucleico e polipeptídeo são de uma planta *Physcomitrella patens*, uma planta de *Glycine max* ou uma planta de *Triticum aestivum*. A invenção provê que estresse ambiental pode ser salinidade, seca, nitrogênio, temperatura, metal, químico, patogênico e estresses oxidativos ou suas combinações. Em formas de realização preferidas, o estresse ambiental pode ser selecionado de um ou mais do grupo consistindo de seca, elevado sal e baixa temperatura.

10 A invenção provê ainda uma semente produzida por uma planta transgênica transformada por um SRP codificando ácido nucleico, em que a planta é reprodução verdadeira para crescimento aumentado sob condições normais e de estresse e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta.

15 A invenção provê ainda um produto agrícola produzido por qualquer uma das plantas transgênicas descritas abaixo, partes de planta, ou sementes. A invenção provê ainda um SRP isolado como descrito abaixo. A invenção provê ainda um SRP isolado codificando ácido nucleico, em que o SRP codificando ácido nucleico codifica um SRP como descrito abaixo.

20 A invenção fornece ainda um vetor de expressão recombinante isolado, compreendendo um SRP codificando ácido nucleico como descrito abaixo, em que a expressão do vetor em uma célula hospedeira resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância aumentada em um estresse ambiental, em comparação com uma
25 variedade de tipo selvagem da célula hospedeira. A invenção provê ainda uma célula hospedeira contendo o vetor e uma planta contendo a célula hospedeira.

 A invenção provê ainda um método para produzir uma planta transgênica com um SRP codificando ácido nucleico, em que a expressão do ácido nucleico na planta resulta no crescimento aumentado da planta sob

condições normais ou de estresse e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental, quando comparada com uma variedade tipo selvagem da planta compreendendo: (a) transformar uma célula de planta com um vetor de expressão compreendendo um SRP codificando ácido nucleico e (b) gerar da
5 célula de planta uma planta transgênica com aumentado crescimento sob condições normais ou de água limitada e/ou uma tolerância aumentada a um estresse ambiental, quando comparada com uma variedade tipo selvagem da planta. Em formas de realização preferidas, o SRP e SRP codificando ácido nucleico são como descritos abaixo.

10 A presente invenção provê ainda um método de identificar um novo SRP, compreendendo (a) elevar uma resposta específica de anticorpo a um SRP ou seu fragmento, como descrito abaixo; (b) selecionar material de SRP putativo com o anticorpo, em que a ligação específica do anticorpo ao material indica a presença de um SRP potencialmente novo; e (c) identificar
15 do material ligado um novo SRP, em comparação com um SRP conhecido. Alternativamente, a hibridização com sondas de ácido nucleico como descrito abaixo pode ser usada para identificar novos ácidos nucleicos de SRP.

A presente invenção também provê métodos de modificar o crescimento das plantas e/ou tolerância ao estresse de uma planta,
20 compreendendo modificar a expressão de um ácido nucleico de SRP na planta, em que o SRP é como descrito abaixo. A invenção provê que este método possa ser realizado de modo que o crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou de tolerância ao estresse seja aumentado ou diminuído. Preferivelmente, o crescimento sob condições normais ou de
25 estresse e/ou tolerância ao estresse é aumentado em uma planta via aumento da expressão de um ácido nucleico de SRP.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a correlação entre o nome do gene e a SEQ ID NO da listagem de seqüência.

A Figura 2 mostra o alinhamento detalhado das seqüências De aminoácido PpAKT-3 (SEQ ID NO: 2, EST472), GmAKT-2 (SEQ ID NO: 4, GM59666231) e TaKT-1 (SEQ ID NO: 6, TA59824966) descritas. O alinhamento foi gerado usando-se Align X do Vetor NTI. Os Aminoácidos que são idênticos através de todas as seqüências são indicados com texto branco e sombreamento preto, os Aminoácidos que são conservados entre as seqüências são indicados com texto negro e sombreamento cinza claro e os Aminoácidos que são similares através de algumas ou de todas as seqüências são indicados com texto branco e sombreamento cinza escuro. O domínio do transportador de potássio está presente em: EST 472 do Aminoácido 78 a 772, TA59824966 do Aminoácido 82 a 732, GM59666231 do Aminoácido 43 a 768.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção pode ser entendida mais prontamente por referência à seguinte descrição detalhada das formas de realização preferidas da invenção e aos Exemplos incluídos aqui. Entretanto, antes dos presentes compostos, composições e métodos serem revelados e descritos, deve ser entendido que esta invenção não é limitada a ácidos nucleicos específicos, polipeptídeos específicos, tipos de célula específicos, células hospedeiras específicas ou métodos específicos etc., visto que tais podem, naturalmente, variar, e as numerosas modificações e variações ali serão evidentes para àqueles hábeis na arte. Deve também ser entendido que a terminologia usada aqui é para fins de descrever formas de realização específicas somente e não é destinada a ser limitante. Em particular, a designação das seqüências De aminoácido como “polipeptídeos relacionados com estresse” (SRPs) não limita de forma alguma a funcionalidade dessas seqüências.

A presente invenção descreve um novo gênero de SRPs e ácidos nucleicos codificando SRP que é importante para modular o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou para

modular uma resposta da planta a um estresse ambiental. Mais particularmente, a modificação da expressão destes ácidos nucleicos codificando SRP em uma planta resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumentada tolerância a um estresse ambiental. Membros representativos do gênero SRP incluem mas não são limitados a PpAKT-3, GmAKT-2 e TaAKt-1. Em uma forma de realização preferida, todos os membros do gênero são transportadores de íons biologicamente ativos.

Portanto, a presente invenção abrange seqüências de polinucleotídeos e de polipeptídeos relacionadas com o estresse e seu uso para aumentar o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumentar a tolerância da planta a um estresse ambiental. Em uma forma de realização, a seqüência de SRP é de uma planta, preferivelmente uma planta *Physcomitrella*, uma planta *Glycine* ou uma planta *Triticum* e, mais preferivelmente, uma planta *Physcomitrella patens*, uma planta *Glycine max* ou uma planta *Triticum aestivum*. Em outra forma de realização, as seqüências de SRP incluem PpAKT-3 (SEQ ID NOs: 1 e 2), GmAKT-2 (SEQ ID NOs: 3 e 4) e TaAKt-1 (SEQ ID NOs: 5 e 6). As seqüências De aminoácido descritas de uma *P. patens* AKT, uma *G. max* AKT e uma *T. aestivum* AKT têm significativa identidade percentual com os transportadores de canal de potássio ativos e são indicadas abaixo.

A presente invenção provê uma célula de planta transgênica transformada por um ácido nucleico codificando SRP, em que a modificação da expressão da seqüência de ácido nucleico na planta resulta em aumentado crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou aumentada tolerância a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da célula de planta. A invenção provê ainda partes de planta transgênicas e plantas transgênicas contendo as células de planta descritas aqui. As partes de planta incluem mas não são limitadas a caules, raízes, óvulos, estames, folhas,

embriões, regiões meristemáticas, tecido caloso, gametófilos, esporófitos, pólen, microsporos e similares. Em uma forma de realização, a planta transgênica é macho estéril. Também provida é uma semente de planta produzida por uma planta transgênica transformada por um ácido nucleico codificando SRP, em que a semente contém o ácido nucleico codificando SRP e em que a planta é reprodução verdadeira para crescimento aumentado sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade de tipo selvagem da planta. A invenção fornece ainda uma semente produzida por uma planta transgênica expressando um SRP, em que a semente contém o SRP e em que a planta é reprodução verdadeira para crescimento aumentado sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta. A invenção também fornece um produto agrícola produzido por qualquer uma das plantas transgênicas descritas abaixo, partes de planta e sementes de planta. Produtos agrícolas incluem mas não são limitados a extratos de planta, proteínas, Aminoácidos, carboidratos, gorduras, óleos, polímeros, vitaminas e similares.

Como aqui usado, o termo “variedade” refere-se a um grupo de plantas dentro de uma espécie que compartilha constantes características que separam-nas da forma típica e das outras possíveis variações dentro daquela espécie. Embora possuindo pelo menos um traço distintivo, uma variedade é também caracterizada por alguma variação entre indivíduos dentro da variedade, com base principalmente na segregação Mendeliana entre a progênie de gerações sucessivas. Uma variedade é considerada “reprodução verdadeira” para um traço particular se for geneticamente homozigoto para aquele traço ao ponto de, quando a variedade de reprodução verdadeira for auto-polinizada, uma quantidade significativa de segregação independente do traço entre a progênie não ser observada. Na presente invenção, o traço surge da expressão transgênica de uma ou mais seqüências

de DNA de SRP introduzida(s) em uma variedade de planta. Como também empregada aqui, a expressão “variedade tipo selvagem” refere-se a um grupo de plantas que são analisadas para fins comparativos como uma planta de controle, em que a planta de variedade tipo selvagem é idêntica à planta de teste (planta transformada com um SRP ou planta em que a expressão do ácido nucleico codificando SRP foi modificado) com exceção de que a planta de variedade tipo selvagem não foi transformada com um ácido nucleico codificando SRP e/ou a expressão do ácido nucleico codificando SRP na planta de variedade tipo selvagem não foi modificada.

A presente invenção descreve que os SRPs *P. patens* (PpAKT-3), os SRPs *Glycine max* (GmAKT-2) e o SRP *Triticum aestivum* (TaAKt-1) são úteis para aumentar o crescimento de uma planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumentar a tolerância de uma planta a um estresse ambiental. Como aqui usado, o termo polipeptídeo refere-se a uma cadeia de pelo menos quatro Aminoácidos unidos por ligações peptídeo. A cadeia pode ser linear, ramificada, circular ou suas combinações. Portanto, a presente invenção provê SRPs isolados, selecionados do grupo consistindo de PpAKT-3, GmAKT-2, TaAKt-1 e seus homólogos. Em formas de realização preferidas, o SRP é selecionado do polipeptídeo transportador do canal de potássio ativo-3 *P. patens* (PpAKT-3), como definido na SEQ ID NO: 2, polipeptídeo transportador do canal de potássio ativo-2 *Glycine max* (GmAKT-2), como definido na SEQ ID NO:4, polipeptídeo transportador do canal de potássio ativo *Triticum aestivum* (TaAKT-1), como definido na SEQ ID NO:6 e seus homólogos e ortólogos. Os homólogos e ortólogos das seqüências De aminoácido são definidos abaixo.

Os SRPs da presente invenção são preferivelmente produzidos por técnicas de DNA recombinante. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo é clonada dentro de um vetor de expressão (como descrito abaixo), o vetor de expressão é introduzido dentro

de uma célula hospedeira (como descrito abaixo) e o SRP é expresso na célula hospedeira. O SRP pode então ser isolado das células por um apropriado esquema de purificação empregando-se técnicas de purificação de polipeptídeo padrão. Para fins da invenção, a expressão “polinucleotídeo recombinante” refere-se a um polinucleotídeo que foi alterado, rearranjado ou modificado por engenharia genética. Exemplos incluem qualquer polinucleotídeo clonado e polinucleotídeos que são ligados ou unidos a seqüências heterólogas. O termo “recombinante” não se refere a alterações em mutações espontâneas. Alternativa para expressão recombinante, um SRP ou seu peptídeo pode ser sintetizado quimicamente usando-se técnicas de síntese de peptídeo padrão. Além disso, os SRPs nativos podem ser isolados das células (p. ex., *P. patens*, *Glycine max*, *Triticum aestivum* ou *Brassica napus*), por exemplo, usando-se um anticorpo anti-SRP, que pode ser produzido por técnicas padrão utilizando-se um SRP ou seu fragmento.

Como aqui usada, a expressão “estresse ambiental” ou “estresse” refere-se a condições subótimas associadas com estresses de salinidade, seca, nitrogênio, temperatura, metal, químico, patogênico e oxidativo. Em formas de realização preferidas, o estresse ambiental pode ser selecionado de um ou mais do grupo consistindo de salinidade, seca ou temperatura ou suas combinações e, em particular, pode ser selecionado de um ou mais do grupo consistindo de alta salinidade, baixo teor de água ou baixa temperatura. Devem também ser entendido que, como usado no relatório e nas reivindicações, “um” ou “uma” podem significar um(a) ou mais, dependendo do contexto e que for usado. Assim, por exemplo, referência a “uma célula” pode significar que pelo menos uma célula pode ser utilizada. Como também usado aqui, a expressão “eficiência de uso de água” refere-se à quantidade de matéria orgânica produzida por uma planta, dividida pela quantidade de água usada pela planta em produzi-la, isto é, o peso seco

de uma planta em relação ao uso de água da planta. Como aqui usada, a expressão “peso seco” refere-se a tudo na planta que não água e inclui, por exemplo, carboidratos, proteínas, óleos e nutrientes minerais.

Como também usados aqui, as expressões “ácido nucleico” e “polinucleotídeo” refere-se ao RNA ou DNA que é linear ou ramificado, de filamento único ou duplo ou um seu híbrido. A expressão também engloba híbridos de RNA/DNA. Estes termos também abrangem seqüência não transladada localizada nas terminações tanto 3’ como 5’ da região codificante do gene: pelo menos cerca de 1000 nucleotídeos da seqüência a montante da extremidade 5’ da região codificante e pelo menos cerca de 100 nucleotídeos da seqüência a jusante da extremidade 3’ da região codificante do gene. Bases menos comuns, tais como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina e outras podem também ser usadas para antissentido, dsRNA e pareamento de ribozima. Por exemplo, os polinucleotídeos que contêm análogos de propina C-5 da uridina e citidina mostraram ligarem-se ao RNA com alta afinidade e serem potentes inibidores antissentido da expressão genética. Outras modificações, tais como modificação da cadeia principal de fosfodiéster ou de 2’-hidróxi do grupo de açúcar da ribose do RNA, podem também ser produzidas. Os polinucleotídeos e ribozimas antissentido podem consistir inteiramente de ribonucleotídeos ou podem contar ribonucleotídeos e deoxirribonucleotídeos misturados. Os polinucleotídeos da invenção podem ser produzidos por qualquer meio, incluindo preparações genômicas, preparações de cDNA, síntese in vitro, RT-PCR e transcrição in vitro ou in vivo.

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 átomo de nitrogênio (isto é, seqüências codificando outros polipeptídeos). Preferivelmente, um ácido nucleico isolado é livre de alguma das seqüências que naturalmente flanqueiam o ácido

nucleico (isto é, seqüências localizadas nas terminações 5' e 3' do ácido nucleico) em sua replicação ocorrendo naturalmente. Por exemplo, um ácido nucleico clonado é considerado isolado. Em várias formas de realização, a molécula de ácido nucleico SRP isolada pode conter menos do que cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ou 0,1 kb de seqüências de ácido nucleico que naturalmente flanqueiam a molécula de ácido nucleico do DNA genômico da célula da qual o ácido nucleico é derivado (p. ex., uma célula *Physcomitrella* patents, uma célula *Glycine max*, uma célula *Triticum aestivum* ou uma célula *Brassica napus*). Um ácido nucleico é também considerado isolado se tiver sido alterado por intervenção humana ou colocado em um local que não seja seu sítio natural ou se for introduzido dentro de uma célula por agroinfecção. Além disso, uma molécula de ácido nucleico “isolada”, tal como uma molécula de cDNA, pode ser livre de algum do outro material celular com que é naturalmente associada ou meio de cultura, quando produzida por técnicas recombinantes, ou precursores químicos ou outros produtos químicos, quando quimicamente sintetizadas.

Especificamente excluídos da definição de “ácidos nucleicos isolados” são os cromossomos naturalmente ocorrentes (tais como espalhamentos de cromossomos), bibliotecas de cromossomos artificiais, bibliotecas genômicas e bibliotecas de cDNA que existam como uma preparação de ácido nucleico *in vivo* ou como uma preparação de célula hospedeira transfectada/transformada, em que as células hospedeiras são uma preparação heterogênea *in vitro* ou revestidas em placa como uma população heterogênea de colônias únicas. Também especificamente excluídas são as bibliotecas acima, em que um ácido nucleico especificado compõe menos do que 5% do número de inserções de ácido nucleico nas moléculas vetoras. Ainda especificamente excluídos são o DNA genômico de células integrais ou preparações de RNA de célula integral (incluindo preparações de células integrais, que são mecanicamente cisalhadas ou enzimaticamente digeridas).

Mesmo mais especificamente excluídas são as preparações de células integrais encontradas como uma preparação in vitro ou como uma mistura heterogênea separada por eletroforese, em que o ácido nucleico da invenção não foi ainda separado dos ácidos nucleicos heterólogos do meio de eletroforese (p. ex., separando-se ainda por excisão de uma única tira de uma população de tiras heterogêneas em um gel de agarose ou mancha de náilon).

Uma molécula de ácido nucleico da presente invenção, p. ex., uma molécula de ácido nucleico tendo uma seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 ou uma sua parte, pode ser isolada usando-se técnicas de biologia molecular padrão e a seqüência de informação provida aqui. Por exemplo, um cDNA de SRP de *P. patens* pode ser isolado de uma biblioteca de *P. patens* usando-se toda a ou uma parte da seqüência descrita aqui. Além disso, uma molécula de ácido nucleico abrangendo toda a ou uma parte da seqüência da SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:5 pode ser isolada pela reação de cadeia de polimerase empregando-se iniciadores de oligonucleotídeo projetados com base nesta seqüência. Por exemplo, o mRNA pode ser isolado de células de planta (p. ex., pelo procedimento de extração de guanidínio-tiocianato de Chirgwin e al, 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299) e o cDNA pode ser preparado usando-se transcriptase reversa (p. ex., transcriptase reversa de Moloney MLV, disponível na Gibco/BRL, Bethesda, MD; ou transcriptase reversa AMV, disponível na Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Os iniciadores de oligonucleotídeo sintéticos para amplificação por reação de cadeia de polimerase podem ser projetados com base na seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:5. Uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser amplificada usando-se um cDNA ou, alternativamente, DNA genômico, como um gabarito e apropriados iniciadores de oligonucleotídeo de acordo com técnicas de amplificação de PCR padrão. A molécula de ácido nucleico assim amplificada pode ser

clonada em um apropriado vetor e caracterizada por análise de seqüência de DNA. Além disso, os oligonucleotídeos correspondendo a uma seqüência de nucleotídeo SRP podem ser preparados por técnicas sintéticas padrão, p. ex., usando-se um sintetizador de DNA automatizado.

5 Em uma forma de realização preferida, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção compreende a seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO: 5. Estes cDNAs podem compreender seqüências codificando o SRP (isto é, a “região codificante”), bem como as seqüências não transladadas 5’ e seqüências não
10 transladadas 3’. Alternativamente, as moléculas de ácido nucleico da presente invenção podem compreender somente a região codificante da SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:5, ou podem conter fragmentos genômicos integrais isolados do DNA genômico. A presente invenção também inclui ácidos nucleicos codificando SRP, que codificam um SRP como descrito
15 aqui. Preferido é um ácido nucleico codificando SRP que codifica um SRP isolado do grupo consistindo de PpAKT-3 (SEQ ID NO:2), GmAKT-2 (SEQ ID NO:4) e TaAKT-1 (SEQ ID NO:6).

 Além disso, a molécula de ácido nucleico da invenção pode compreender uma parte da região codificante da seqüência da SEQ ID NO: 1,
20 SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:5, por exemplo, um fragmento que pode ser usado como uma sonda ou iniciador ou um fragmento codificando uma parte biologicamente ativa de um SRP. As seqüências de nucleotídeo determinadas pela clonagem dos genes de SRP de *P. patens*, *G. max* e *T. aestivum* permitem a geração de sondas e iniciadores projetados para uso na
25 identificação e/ou clonagem de homólogos de SRP em outros tipos de células e organismos, bem como homólogos de SRP de outros musgos e espécies relacionadas. A parte da região codificante também pode codificar um fragmento biologicamente ativo e espécies relacionadas. A parte da região codificante também pode codificar um fragmento biologicamente ativo de um

SRP.

Como aqui usada, a expressão “parte biologicamente ativa de” um SRP é destinada a incluir uma parte, p. ex., um domínio/motivo, de um SRP que participa da modulação do crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou modulação de tolerância ao estresse em uma planta e, mais preferivelmente, tolerância à estiagem ou tolerância ao sal. Para fins da presente invenção, modulação do crescimento de planta sob condições normais ou limitada pela água e/ou tolerância a estresse referem-se a pelo menos um aumento ou diminuição de 10% no crescimento sob condições normais ou limitado por água e/ou pelo menos um aumento ou diminuição de 10% da tolerância ao estresse de uma planta transgênica compreendendo um cassete de expressão SRP (ou vetor de expressão), em comparação com o crescimento sob condições normais ou limitada por água e/ou tolerância ao estresse de uma variedade tipo selvagem de controle da planta. Métodos para quantificar o crescimento sob condições normais ou limitadas pela água e/ou tolerância ao estresse são providos pelo menos nos Exemplos 8, 13 e 14 abaixo. Em uma forma de realização preferida, a parte biologicamente ativa de um SRP aumenta o crescimento de uma planta sob condições normais ou limitada pela água e/ou a tolerância da planta a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem de controle da planta.

Partes biologicamente ativas de um SRP incluem peptídeos compreendendo seqüências De aminoácido derivadas da seqüência De aminoácido de um SRP, p. ex., uma seqüência De aminoácido da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou a seqüência De aminoácido de um polipeptídeo idêntico a um SRP, que inclui menos Aminoácidos do que um SRP de comprimento total ou o polipeptídeo de comprimento total que é idêntico a um SRP e exibe pelo menos uma atividade de um SRP. Tipicamente, as partes biologicamente ativas (p. ex., peptídeos que são, por exemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 ou mais

Aminoácidos de comprimento) compreendem um domínio ou um motivo com pelo menos uma atividade de um SRP. Além disso, outras partes biologicamente ativas em que outras regiões do polipeptídeo são deletadas, podem ser preparadas por técnicas recombinantes e avaliadas quanto a uma ou mais das atividades descritas aqui. Como mostrado na Figura 2, o domínio do transportador do potássio está presente em EST 472 do Aminoácido 78 ao Aminoácido 772, TA59824966 do Aminoácido 732 ao Aminoácido 732, GM59666231 do Aminoácido 43 ao Aminoácido 768.

A invenção também fornece polipeptídeos quiméricos ou de fusão de SRP. Como aqui usado, um “polipeptídeo químérico” ou “polipeptídeo de fusão” de SRP compreende um SRP operativamente ligado a um não-SRP. Um SRP refere-se a um polipeptídeo tendo uma seqüência De aminoácido correspondendo a um SRP, enquanto que um não-SRP refere-se a um polipeptídeo tendo uma seqüência De aminoácido correspondendo a um polipeptídeo que não é substancialmente idêntico ao SRP, p. ex., um polipeptídeo que é diferente do SRP e é derivado do mesmo ou de um diferente organismo. Com respeito ao polipeptídeo de fusão, a expressão “operativamente ligado” é destinada a indicar que o SRP e o não-SRP são fundidos entre si, de modo que ambas as seqüências satisfaçam a função proposta atribuída à seqüência usada. O não-SRP pode ser fundido ao término-N ou término-C do SRP. Por exemplo, em uma forma de realização, o polipeptídeo de fusão é um polipeptídeo de fusão GST-SRP em que as seqüências de SRP são fundidas ao término-C das seqüências GST. Tais polipeptídeo de fusão podem facilitar a purificação dos SRPs recombinantes. Em outra forma de realização, o polipeptídeo de fusão é um SRP contendo uma seqüência de sinal heteróloga em seu término-N. Em certas células hospedeiras (p. ex., células hospedeiras mamíferas), a expressão e/ou secreção de um SRP podem ser aumentadas através do uso de uma seqüência de sinal heteróloga.

Preferivelmente, um polipeptídeo quimérico ou de fusão SRP da invenção é produzido por técnicas de DNA recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de DNA codificando para as diferentes seqüências de polipeptídeo são ligados entre si na estrutura de acordo com técnicas convencionais, por exemplo, empregando-se terminais de extremidade embotada ou escalonada para ligação, digestão de enzima de restrição para fornecer apropriados terminos, enchimento de extremidades coesivas como apropriado, tratamento de fosfatase alcalina para evitar indesejáveis união e ligação enzimática. Em outra forma de realização, o gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas convencionais incluindo sintetizadores de DNA automatizados. Alternativamente, a amplificação PCR dos fragmentos genéticos pode ser realizada usando-se outros iniciadores de ancoragem, que dão origem a projeções complementares entre dois consecutivos fragmentos de gene que podem subsequente ser recozidos e reamplificados para gerar uma seqüência de gene quimérica (vide, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al., 1992, John Wiley & Sons). Além disso, são comercialmente disponíveis muitos vetores de expressão que já codificam um componente de fusão (p. ex., um polipeptídeo GST). Um ácido nucleico codificando SRP pode ser clonado em tal vetor de expressão, de modo que o componente de fusão seja ligado na estrutura ao SRP.

Além dos fragmentos e polipeptídeos de fusão dos SRPs descritos aqui, a presente invenção inclui homólogos e análogos de SRPs naturalmente ocorrentes e SRP codificando ácidos nucleicos em uma planta. “Homólogos” são definidos aqui como dois ácidos nucleicos ou polipeptídeos que têm seqüências de nucleotídeos ou De aminoácido substancialmente idênticas, respectivamente. Homólogos incluem variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas e antagonistas de SRPs como definido a seguir. O termo “homólogo” abrange ainda moléculas de ácido nucleico que diferem de uma ou mais das seqüências de ácido nucleico mostradas na SEQ ID NO:1, SEQ

ID NO:3 ou SEQ ID NO: 5 (e partes delas) devido à degeneração do código genético e, assim, codificam o mesmo SRP como aquele codificado pelas seqüências de nucleotídeos mostradas na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO: 5. Como aqui usado, um SRP “naturalmente ocorrente” refere-se a uma seqüência De aminoácido de SRP que ocorre na natureza. Preferivelmente, um SRP naturalmente ocorrente compreende uma seqüência De aminoácido como mostrada na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6.

Um agonista do SRP pode reter substancialmente as mesmas ou um subconjunto das atividades biológicas do SRP. Um antagonista do SRP pode inibir uma ou mais das atividades da forma naturalmente ocorrente do SRP. Por exemplo, o antagonista de SRP pode competitivamente ligar-se a um membro a jusante ou a montante da cascata metabólica do componente de membrana de célula que inclui o SRP, ou ligar-se a um SRP que medeia o transporte de compostos através de tais membranas, desse modo evitando que a translocação ocorra.

As moléculas de ácido nucleico correspondendo a variantes alélicas naturais e análogos, ortólogos e parólogos de um cDNA de SRP podem ser isoladas com base em sua identidade com os ácidos nucleicos *P. patens*, *G. max* ou *T. aestivum* descritos aqui, utilizando-se cDNAs de SRP ou uma parte deles, como uma sonda de hibridização de acordo com técnicas de hibridização padrão sob rigorosas condições de hibridização. Em uma forma de realização alternativa, os homólogos de SRP podem ser identificados por avaliação de bibliotecas combinatoriais de mutantes, p. ex., mutantes de truncamento do SRP para atividade de agonista ou antagonista de SRP. Em uma forma de realização, uma biblioteca diversificada de variantes de SRP pode ser produzida, por exemplo, ligando-se enzimaticamente uma mistura de oligonucleotídeos sintéticos dentro das seqüências genéticas, de modo que um conjunto degenerado de seqüências SRP potenciais seja exprimível como

polipeptídeos individuais ou, alternativamente, como um conjunto de maiores polipeptídeos de fusão (p. ex., para exibição de fago) contendo nele seqüências de SRP. Há uma variedade de métodos que podem ser usados para produzir bibliotecas de homólogos SRP potenciais de uma seqüência de oligonucleotídeo degenerada. Sínteses químicas de uma seqüência genética degenerada podem ser realizadas em um sintetizador de DNA automatizado e o gene sintético é então ligado dentro de um apropriado vetor de expressão. O uso de um conjunto degenerado de genes permite a provisão, em uma mistura de todas as seqüências codificando o desejado conjunto de seqüências SRP potenciais. Métodos para sintetizar oligonucleotídeos degenerados são conhecidos na arte (Vide, p. ex., 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 Acid Res. 11:477).

Além disso, bibliotecas de fragmentos das regiões codificando SRP podem ser usadas para gerar uma população diversificada de fragmentos de SRP para avaliação e subsequente seleção de homólogos de um SRP. Em uma forma de realização, uma biblioteca de fragmentos de seqüência codificante pode ser gerada tratando-se um fragmento de PCR de duplo filamento de uma seqüência codificando SRP com uma nuclease sob condições em que entalhamento ocorre somente cerca de uma vez por molécula, desnaturando o DNA de duplo filamento, renaturando o DNA para formar DNA de duplo filamento, que pode incluir pares de sentido/antissentido de diferentes produtos entalhados, removendo-se partes de filamento único de duplexes reformados, por tratamento com nuclease S1 e ligando-se a resultante biblioteca de fragmentos em um vetor de expressão. Por este método, pode ser derivada uma biblioteca de expressão que codifica o terminal-N, terminal-C e fragmentos de terminal de vários tamanhos do SRP.

Diversas técnicas são conhecidas na arte para avaliar os

produtos genéticos de bibliotecas combinatórias produzidas por mutações ou truncamentos pontuais e para avaliar bibliotecas de cDNA para produtos genéticos tendo uma propriedade selecionada. Tais técnicas são adaptáveis para rápida avaliação das bibliotecas genéticas geradas pela mutagênese combinatória de homólogos de SRP. As técnicas mais largamente usadas, que são receptivas a análise de alta produção, para avaliar grande bibliotecas genéticas, incluem clonagem da biblioteca de genes em vetores de expressão replicáveis, transformação de células apropriadas com a biblioteca de vetores resultante e expressão dos genes combinatórias sob condições em que a detecção de uma desejada atividade facilita o isolamento do vetor codificando o gene, cujo produto foi detectado. Mutagênese conjunta recursiva (REM), uma técnica que aumenta a frequência de mutantes funcionais nas bibliotecas, pode ser usada em combinação com os ensaios de triagem para identificar os homólogos de SRP (Arkin e Yourvan, 1992, PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al., 1993, Polypeptide Engineering 6(3):327-331). Em outra forma de realização, os ensaios baseados em célula podem ser explorados para analisar uma biblioteca de SRP diversificada, empregando-se métodos bem conhecidos na arte. A presente invenção provê ainda um método de identificar um novo SRP, compreendendo (a) suscitando uma resposta anticorpo específica a um SRP ou um seu fragmento, como descrito aqui; (b) selecionando-se material SRP putativo como anticorpo, em que ligação específica do anticorpo ao material indica a presença de um SRP potencialmente novo; e (c) analisando-se o material ligado em comparação com SRP conhecido, para determinar sua novidade.

Como citado acima, a presente invenção inclui SRP e seus homólogos. Para determinar a identidade de seqüência percentual de duas seqüências De aminoácido (p. ex., uma das seqüências de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO: 6 e uma sua forma mutante), as seqüências são alinhadas para fins de comparação ótima (p.ex., vão podem ser introduzidos

na seqüência de um polipeptídeo para alinhamento ótimo com o outro polipeptídeo ou ácido nucleico). Os resíduos Aminoácidos nas posições De aminoácido correspondentes são então comparados. Quando uma posição de uma seqüência (p. ex., das seqüências da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6) é ocupada pelo mesmo resíduo Aminoácido que da correspondente posição da outra seqüência (p. ex., forma mutante da seqüência selecionada das seqüências de polipeptídeo da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6), então as moléculas são idênticas naquela posição. O mesmo tipo de comparação pode ser feito entre duas seqüências de ácido nucleico.

A identidade de seqüência percentual entre as duas seqüências é função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, identidade de seqüência percentual = $\frac{\text{números de posições idênticas}}{\text{números totais das posições}} \times 100$). Preferivelmente, os homólogos de Aminoácido isolados, incluídos na presente invenção, são pelo menos de cerca de 50 – 60%, preferivelmente pelo menos cerca de 60 – 70% e, mais preferivelmente, pelo menos 70 – 75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, ou 90-95%, e muitíssimo preferivelmente pelo menos cerca de 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais idênticos a uma inteira seqüência De aminoácido mostrada na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6. Em ainda outra forma de realização, os homólogos Aminoácidos isolados, incluídos na presente invenção, são pelo menos de cerca de 50 – 60%, preferivelmente pelo menos cerca de 60 – 70% e, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, ou 90-95%, e muitíssimo preferivelmente pelo menos cerca de 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais idêntica a uma inteira seqüência De aminoácido codificada por uma seqüência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5. Em outras formas de realização, os homólogos Aminoácidos SRP têm identidade de seqüência através de pelo menos 15 resíduos Aminoácidos contíguos, mais preferivelmente pelo menos

25 resíduos Aminoácidos contíguos e, muitíssimo preferivelmente, pelo menos 35 resíduos Aminoácidos contíguos da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

Em outra forma de realização preferida, um homólogo de
5 ácido nucleico da invenção compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos de cerca de 40 – 60%, preferivelmente pelo menos cerca de 60 – 70%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 70 – 75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, ou 90-95%, e mesmo mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais idêntica a uma sequência de nucleotídeo
10 mostrada na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, ou a uma parte compreendendo pelo menos 660 de seus nucleotídeos consecutivos. O comprimento preferível da comparação de sequência para ácidos nucleicos é de pelo menos 75 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 100 nucleotídeos e, muitíssimo preferivelmente, o inteiro comprimento da região
15 de codificação. É mesmo mais preferível que os homólogos de ácido nucleico codifiquem proteínas tendo homologia com a SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6 através dos domínios funcionais mostrados abaixo.

É ainda preferido que o homólogo de ácido nucleico isolado ou a invenção codifique um SRP, ou sua parte, que seja pelo menos 90%,
20 mais preferivelmente pelo menos 95% idêntica a uma sequência De aminoácido da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, e que funcione como um modulador de crescimento de planta e/ou uma resposta a estresse ambiental em uma planta. Em uma forma de realização mais preferida, a superexpressão do homólogo de ácido nucleico em uma planta
25 aumenta o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumenta a tolerância da planta ao estresse ambiental. Em uma outra forma de realização preferida, o homólogo de ácido nucleico codifica um SRP que funciona como um transportador de íon, mais preferivelmente, um transportador de canal de potássio ativo.

Para fins da invenção, a identidade de seqüência percentual entre duas seqüências de ácido nucleico ou de polipeptídeo é determinada usando-se o pacote de software Vetor NTI 9,0 (PC) (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA92008). Uma perda de abertura de vão de 15 e uma perda de extensão de vão de 6,66 são usadas para determinar a identidade percentual de dos ácidos nucleicos. Uma perda de abertura de vão de 10 e uma perda de extensão de vão de 0,1 são usadas para determinar a identidade percentual de dois polipeptídeos. Todos os outros parâmetros são ajustados nos ajustes padrão. Para fins de um múltiplo alinhamento (algoritmo de Clustal W), a perda de abertura de vão é 10 e a perda de extensão de vão é de 0,05 com matriz biosum62. Deve ser entendido que, para fins de determinar a identidade de seqüência quando comparando-se uma seqüência de DNA com uma seqüência de RNA, um nucleotídeo de timidina é equivalente a um nucleotídeo de uracila.

Em outro aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico isolado, compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza no polinucleotídeos da SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5 sob condições rigorosas. Mais particularmente, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção é pelo menos de 15 nucleotídeos de comprimento e hibridiza sob rigorosas condições na molécula de ácido nucleico compreendendo uma seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5. Em outras formas de realização, o ácido nucleico é pelo menos de 30, 50, 100, 250, ou mais nucleotídeos de comprimento. Preferivelmente, um homólogo de ácido nucleico isolado da invenção compreende uma seqüência de nucleotídeo que hibridiza sob condições altamente rigorosas na seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, e funciona como um modulador do crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou um modulador para tolerância a estresse em uma planta. Em uma outra formas de realização preferida, a superexpressão do homólogo de ácido

nucleico isolado de uma planta aumenta o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumenta a tolerância da planta a um estresse ambiental. Em uma forma de realização mesmo mais preferida, o homólogo de ácido nucleico isolado codifica um SRP que funciona como um transportador de íon, mais preferivelmente, um transportador do canal de potássio ativo.

Como usado aqui com respeito à hibridização para de DNA a uma mancha de DNA, a expressão “rigorosas condições” refere-se a hibridização durante a noite a 60°C em solução de Denhart 10X, SSC 6X, 0,5 % SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmon desnaturado. As manchas são lavadas sequencialmente a 62°C por 30 minutos cada vez em 3X SSC/0,1% SDS, seguido por 1X SSC/0,1% SDS e, finalmente, 0,1X SSC/0,1% SDS. Como também usado aqui, em uma forma de realização preferida, a frase “rigorosas condições” refere-se a hibridização em uma solução 6X SCC a 65°C. Em outra forma de realização, “condições altamente rigorosas” refere-se a hibridização durante a noite a 65°C em solução Denhart 10X, 6X SSC, 0,5 SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. As manchas são lavadas seqüencialmente a 65°C por 30 minutos cada vez em 3X SSC/0,1% SDS, seguido por 1X SSC/0,1% SDS e, finalmente, 0,1X SSC/0,1% SDS. Métodos para hibridizações de ácido nucleico são descritos em Meinkoth e Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138:267-284; Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Ausubel et al., eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1995; and Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, Nova Iorque, 1993. Preferivelmente, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção, que hibridiza sob condições rigorosas ou altamente rigorosas em uma seqüência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, corresponde a uma molécula de ácido nucleico naturalmente ocorrente. Como

usado aqui, molécula de ácido nucleico “naturalmente ocorrente” refere-se a uma molécula de RNA ou DNA tendo uma seqüência de nucleotídeo que ocorre na natureza (p. ex., codifica um polipeptídeo natural). Em uma forma de realização, o ácido nucleico codifica um SRP *P. patens*, SRP *G. max* ou SRP *T. aestivum* naturalmente ocorrente.

Empregando-se os métodos acima descritos e outros conhecidos daqueles hábeis na arte, uma pessoa de habilidade comum na arte pode isolar homólogos do SRP compreendendo a seqüência De aminoácido mostrada na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6. Um subconjunto destes homólogos são variantes alélicas. Como usada aqui, a expressão “variante alélica” refere-se a uma seqüência de nucleotídeo contendo polimorfismo que resulta em mudanças nas seqüências De aminoácido de um SRP e que existem dentro de uma população natural (p. ex., uma espécie ou variedade de planta). Tais variações alélicas naturais podem tipicamente resultar em variação de 1 – 5% de um ácido nucleico SRP. As variantes alélicas podem ser identificadas seqüenciado a seqüência de ácido nucleico de interesse em numerosas diferentes plantas, o que pode ser prontamente realizado utilizando-se sondas de hibridização para identificar o mesmo local genético SRP naquelas plantas. Qualquer uma e todas tais variações de ácido nucleico e polimorfismos ou variações de Aminoácido resultantes em um SRP que são o resultado de variação alélica natural e que não alteram a atividade funcional de um SRP, são destinadas a situar-se dentro do escopo da invenção.

Além disso, moléculas de ácido nucleico codificando SRPs da mesma ou outras espécies tais como análogos, ortólogos e parálogos de SRP são destinadas a situar-se dentro do escopo da presente invenção. Como aqui usado, o termo “análogos” refere-se a dois ácidos nucleicos que têm a mesma função ou função similar, mas que evoluíram separadamente em organismos não-relacionados. Como aqui usado, o termo “ortólogos” refere-se a dois

ácidos nucleicos de diferentes espécies, porém que evoluíram de um gene ancestral comum por especiação. Normalmente, os ortólogos codificam polipeptídeos tendo as mesmas ou similares funções. Como também usado aqui, o termo “parálogos” refere-se a dois ácidos nucleicos que são

5 relacionados por duplicação dentro de um genoma. Os parálogos usualmente têm diferentes funções, porém estas funções podem ser relacionadas (Tatusov et al., 1997, Science 278(5338): 631-637). Os análogos, ortólogos e parálogos de um SRP naturalmente ocorrente podem diferir do SRP naturalmente

10 De aminoácido ou por ambas. As modificações pós-translacionais incluem derivação química in vivo e in vitro de polipeptídeos, por exemplo, acetilação, carboxilação, fosforilação ou glicosilação e tais modificações podem ocorrer durante a síntese ou processamento do polipeptídeo ou em seguida a

15 tratamento com enzimas modificadoras isoladas. Em particular, os ortólogos da invenção geralmente exibirão pelo menos 80 – 85%, mais preferivelmente 85 – 90% ou 90 – 95% e, muitíssimo preferivelmente 95%, 96%, 97%, 98%, ou mesmo 99% de identidade, ou 100% de identidade de sequência, com toda ou parte de uma sequência De aminoácido de SRP naturalmente ocorrente e

20 exibirão uma função similar a um SRP. Preferivelmente, um ortólogo de SRP da presente invenção funciona como um modulador de crescimento de planta e/ou uma resposta a estresse ambiental em uma planta e/ou funcionar como um transportador de íon. Mais particularmente, um ortólogo de SRP aumenta o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou aumenta a tolerância ao estresse de uma planta. Em uma forma de realização, os

25 ortólogos de SRP mantêm a capacidade de participar do metabolismo de compostos necessários para a construção das membranas celulares de uma planta ou do transporte de moléculas através destas membranas.

Além das variantes naturalmente ocorrentes de uma sequência de SRP que possa existir na população, o artífice hábil observará ainda que

mudanças podem ser introduzidas por mutação em uma sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, desse modo resultando em mudanças na sequência De aminoácido do SRP codificado, sem alterar a atividade funcional do SRP. Por exemplo, substituições de nucleotídeo resultando em substituições De aminoácido em resíduos Aminoácidos “não essenciais” podem ser feitas em uma sequência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5. Um resíduo Aminoácido “não essencial” é um resíduo que pode ser alterado da sequência tipo selvagem de um dos SRPs sem alterar a atividade de dito SRP, enquanto que um resíduo Aminoácido “essencial” é necessário para a atividade de SRP. Outros resíduos Aminoácidos, entretanto (p. ex., aqueles que não são conservados ou somente semi-conservados no domínio tendo atividade SRP), podem não ser essenciais para a atividade e, assim, são igualmente para ser receptivos a alteração sem alterar a atividade de SRP.

Portanto, outro aspecto da invenção pertence a moléculas de ácido nucleico codificando SRPs que contêm mudanças nos resíduos Aminoácidos que não são essenciais para a atividade de SRP. Tais SRPs diferem em sequência De aminoácido de uma sequência contida na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, embora retenha pelo menos uma das atividades de SRP descritas aqui. Em uma forma de realização, a molécula de ácido nucleico isolada compreende uma sequência de nucleotídeo codificando um polipeptídeo, em que o polipeptídeo compreende uma sequência De aminoácido pelo menos de cerca de 50% idêntica a uma sequência De aminoácido de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6. Preferivelmente, o polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico é pelo menos cerca de 50 – 60% idêntica a uma sequência De aminoácido da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, mais preferivelmente pelo menos cerca de 60 – 70% idêntica a uma sequência De aminoácido da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, mesmo mais preferivelmente pelo

menos cerca de 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, ou 90-95% idêntica a uma seqüência De aminoácido de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, e muitíssimo preferivelmente pelo menos cerca de 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica a uma seqüência De aminoácido da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6. Os homólogos de SRP preferidos da presente invenção preferivelmente participam do crescimento de uma planta e/ou uma resposta de tolerância a estresse ou, mais particularmente, funcionam como um transportador de íon, preferivelmente como um transportador de canal de potássio ativo.

Uma molécula de ácido nucleico isolada codificando um SRP tendo identidade de seqüência com uma seqüência de polipeptídeo SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, pode ser criada introduzindo-se uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeo dentro de uma seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, respectivamente, de modo que uma ou mais substituições, adições ou deleções de Aminoácido são introduzidas dentro da polipeptídeo codificado. As mutações podem ser introduzidas dentro da seqüência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5 por técnicas padrão, tais como mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR. Preferivelmente, as substituições De aminoácido conservativas são feitas em um ou mais resíduos Aminoácidos não essenciais preditos. Uma “seqüência De aminoácido conservativa” é uma em que o resíduo Aminoácido é substituído por um resíduo Aminoácido tendo uma cadeia lateral similar.

As famílias de resíduos Aminoácidos tendo cadeias laterais similares foram definidas na arte. Estas famílias incluem Aminoácidos com cadeias laterais básicas (p. ex., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (p. ex., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (p. ex., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (p. ex., alanina, valina, leucina,

isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (p. ex., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (p. ex., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo Aminoácido não-essencial predito de um SRP é preferivelmente substituído por outro resíduo Aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Alternativamente, em outra forma de realização, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte da seqüência de codificação de SRP, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser avaliados quanto à atividade SRP descrita aqui para identificar mutantes que retêm a atividade SRP. Em seguida à mutagênese da seqüência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, o polipeptídeo codificado pode ser expresso recombinantemente e a atividade do polipeptídeo pode ser determinada analisando-se a tolerância ao estresse ou crescimento sob condições normais ou limitadas pela água da planta, por exemplo, como descrito no Exemplo 8.

Adicionalmente, ácidos nucleicos SRP otimizados podem ser criados. Preferivelmente, um ácido nucleico SRP otimizado codifica um SRP que se liga a um grupo fosfato e/ou modula o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou a tolerância a um estresse ambiental e, mais preferivelmente, aumenta o crescimento da planta sob condições sob condições normais ou de estresse e/ou a tolerância a um estresse ambiental em sua superexpressão na planta. Como aqui usado, “otimizado refere-se a um ácido nucleico que é geneticamente construído para aumentar sua expressão em uma dada planta ou animal. Para fornecer ácidos nucleicos SRP otimizados de planta, a seqüência de DNA do gene pode ser modificada para 1) compreender códons preferidos por genes de planta altamente expressos; 2) compreender um teor A+T na composição de base do nucleotídeo àquela substancialmente encontrada em plantas; 3) formar uma seqüência de iniciação de planta; ou 4) eliminar as seqüências que causam desestabilização,

poliadenilação inapropriada, degradação e terminação de RNA ou que formam grampos de cabelo de estrutura secundária ou sítios de junção de RNA. A expressão aumentada dos ácidos nucleicos SRP em plantas pode ser conseguida utilizando-se a freqüência de distribuição de uso de códon em plantas em geral ou em uma planta particular. Métodos para otimizar a expressão de ácido nucleico em plantas podem ser encontrados em EPA 0359472; EPA 0385962; Pedido PCT No.. WO 91/16432; Patente U.S. 5.380.831; Patente U.S. 5.436.391; Perlack et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; and Murray et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17:477-498.

Um ácido nucleico SRP pode ser otimizado de modo que sua freqüência de distribuição de uso de códon desvie-se, preferivelmente, não mais do que 25% daquela dos genes de planta altamente expressos e, mais preferivelmente, não mais do que cerca de 10%. Além disso, é considerada a percentagem de teor G+C da terceira base degenerada (as monocotiledôneas parecem favorecer G+C nesta posição, enquanto que as dicotiledôneas não). É também reconhecido que o nucleotídeo XCG (em que X é A, T, C ou G) é o menos preferido códon em dicotiledôneas, enquanto que o códon XTA é evitado tanto em monocotiledôneas como dicotiledôneas. Os ácidos nucleicos de SRP desta invenção TAMBÉM preferivelmente têm índices de evitação parêntese CG e TA estreitamente aproximando-se daqueles da planta hospedeira escolhida (p. ex., *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum*). Mais preferivelmente, estes índices desviam-se daquela do hospedeiro em não mais do que cerca de 10 – 15%.

Além das moléculas de ácido nucleico codificando os SRPs descritos acima, outro aspecto da invenção pertence a moléculas de ácido nucleico isoladas, que são antissentido a elas. Os polinucleotídeos antissentido pensa-se inibir a expressão genética de um polinucleotídeo alvo ligando-se especificamente ao polinucleotídeo alvo e interferindo com a transcrição, junção, transporte, translação e/ou estabilidade do polinucleotídeo

alvo. São descritos métodos na arte anterior para alvejar o polinucleotídeos antissentido no DNA cromossomal, em um transcrito de RNA primário ou a um mRNA processado. Preferivelmente, as regiões alvo incluem sítios de junção, códons de iniciação de translação, códons de terminação de translação e outras seqüências dentro do quadro de leitura aberto.

O termo “antissentido”, para fins da invenção, refere-se a um ácido nucleico compreendendo um polinucleotídeos que é suficientemente complementar a todo ou uma parte de um mRNA de gene, transcrito primário ou processado, a fim de interferir com a expressão do gene endógeno.

Polinucleotídeos “complementares” são aqueles que são capazes de pareamento de base de acordo com as regras complementares de Watson-Crick. Especificamente, as purinas formaram pares básicos com as pirimidinas, para formar uma combinação de guanina pareada com citosina (G:C) e adenina pareada com timina (A:T) no caso de DNA, ou adenina pareada com uracila (A:U) no caso de RNA. Entende-se que dois polinucleotídeos podem hibridizar entre si mesmo se eles não forem completamente complementares entre si, desde que cada um tenha pelo menos uma região que seja substancialmente complementar à outra. A expressão “ácido nucleico antissentido” inclui RNA de filamento único, bem como cassetes de expressão de DNA de duplo filamento, que possam ser transcritos para produzir um RNA antissentido. Os ácidos nucleicos antissentido “ativos” são moléculas de RNA antissentido que são capazes de seletivamente hibridizar com um transcrito primário ou mRNA codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 80% de identidade de seqüência com o polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

O ácido nucleico antissentido pode ser complementar a um filamento codificando SRP ou a somente uma parte dele. Em uma forma de realização, uma molécula de ácido nucleico antissentido é antissentido a uma “região de codificação” do filamento codificante de uma seqüência de

nucleotídeo codificando um SRP. A expressão “região codificante” refere-se à região da sequência de nucleotídeo compreendendo códons que são traduzidos para dentro de resíduos Aminoácidos. Em outra forma de realização, a molécula de ácido nucleico antissentido é antissentido a uma

5 “região não-codificante” do filamento codificante de uma sequência de nucleotídeo codificando um SRP. A expressão “região não-codificante” refere-se às seqüências 5’ e 3’ que flanqueiam a região codificante que não são traduzidas para dentro dos Aminoácidos (isto é, também referidas como regiões não traduzidas 5’ e 3’). A molécula de ácido nucleico antissentido

10 pode ser complementar à inteira região codificante de mRNA SRP, porém mais preferivelmente é um oligonucleotídeo, que é antissentido a somente uma parte da região codificante ou não-codificante de mRNA SRP. Por exemplo, o oligonucleotídeo antissentido pode ser complementar à região circundando o sítio de início de translação do mRNA SRP. Um

15 oligonucleotídeo antissentido pode ter, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 nucleotídeos de comprimento. Tipicamente, as moléculas antissentido da presente invenção compreendem um RNA tendo 60 – 100% de identidade de seqüência com pelo menos 14 nucleotídeos consecutivos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5, ou um

20 polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6. Preferivelmente, a identidade de seqüência será pelo menos de 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98%, e muitíssimo preferivelmente 99%.

As moléculas de ácido nucleico antissentido da invenção são

25 tipicamente administradas a uma célula ou geradas in situ, de modo que elas hibridizem com ou liguem-se a um mRNA celular e/ou DNA genômico codificando um SRP para, desse modo, inibir a expressão do polipeptídeo, por exemplo, inibindo a transcrição e/ou translação. A hibridização pode ser por complementaridade de nucleotídeo convencional, para formar um duplex

estável ou, por exemplo, no caso de uma molécula de ácido nucleico antissentido que se ligue a duplexes de DNA, através de interações específicas do entalhe principal da hélice dupla. A molécula antissentido pode ser modificada de modo que especificamente ligue-se a um receptor ou um antígeno expresso em uma superfície de célula selecionada, p. ex., ligando a molécula de ácido nucleico antissentido a um peptídeo ou um anticorpo que se ligue a um receptor ou antígeno de superfície de célula. A molécula de ácido nucleico antissentido também pode ser suprida a células utilizando-se os vetores aqui descritos. Para obterem-se concentrações intracelulares suficientes das moléculas antissentido, as construções de vetor em que a molécula de ácido nucleico antissentido é colocada sob o controle de um forte promotor procariótico, viral ou eucariótico (incluindo planta) são preferidas.

Como uma alternativa aos polinucleotídeos antissentido, podem ser usados ribozimas, polinucleotídeos de sentido ou RNA de duplo filamento (dsRNA), para reduzir a expressão de um polipeptídeo SRP. Como aqui usado, o termo “ribozima” refere-se a uma enzima catalítica baseada em RNA com atividade de ribonuclease que é capaz de clivar um ácido nucleico de filamento único, tal como um mRNA, em que ele tem uma região complementar. As riboximas (p. ex., ribozimas cabeça de martelo descritas em Haselhoff e Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591) pode ser usadas para cataliticamente clivar os transcritos de mRNA SRP para, desse modo, inibir a translação do mRNA SRP. Uma ribozima tendo especificidade para um ácido nucleico codificando SRP pode ser projetada com base na seqüência de nucleotídeo de um cDNA SRP, como descrito aqui (isto é., SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5) ou com base em uma seqüência heteróloga a ser isolada de acordo com métodos ensinados nesta invenção. Por exemplo, um derivativo de um RNA *Tetrahymena* L-19 IVS pode ser construído em que a seqüência de nucleotídeo do sítio ativo é complementar a seqüência de nucleotídeo a ser clivada em um mRNA codificando SRP (Vide, p. ex.,

Patentes U.S. Nos. 4.987.071 e 5.116.742 de Cech e al). Alternativamente, o mRNA de SRP pode ser usado para selecionar um RNA catalítico tendo uma atividade de ribonuclease específica de um pool de moléculas de RNA (Vide, p. ex., Bartel and Szostak, 1993, Science 261: 1411-1418). Em formas de realização preferidas, a ribozima conterà uma parte tendo pelo menos 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, ou 20 nucleotídeos e, mais preferivelmente, 7 ou 8 nucleotídeos, que têm 100% de complementaridade a uma parte do RNA alvo. Método para produzir riboximas são conhecidos daqueles hábeis na arte (Vide, p. ex., Patentes U.S. Nos. 6.025.167; 5.773.260; e 5.496.698).

O termo “dsRNA,” como aqui usado, refere-se a híbridos de RNA compreendendo dois filamentos de RNA. Os dsRNAs podem ser de estrutura linear ou circular. Em uma forma de realização preferida, o dsRNA é específico para um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6, ou um polipeptídeo tendo pelo menos 80% identidade de sequência com um polipeptídeo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6. Os RNAs hibridizantes podem ser substancial ou completamente complementares. Por “substancialmente complementares” pretendemos significar que, quando os dois RNAs hibridizantes são otimamente alinhados usando-se o programa BLAST como descrito acima, as partes hibridizantes são pelo menos 95% complementares. Preferivelmente, o dsRNA terá pelo menos 100 pares de base de comprimento. Tipicamente, os RNAs hibridizantes serão de comprimento idêntico sem projeções 5’ ou 3’ e sem intervalos. Entretanto, os dsRNAs sem terminações 5’ ou 3’ projetantes de até 100 nucleotídeos podem ser usados nos métodos da invenção.

O dsRNA pode compreender ribonucleotídeos, análogos de ribonucleotídeo, tais como resíduos de 2’-O-metil ribosila, ou suas combinações (Vide, p. ex., Patentes U.S. Nos. 4.130.641 and 4.024.222). Um ácido polirribinosínico : ácido polirribocitidílico de dsRNA é descrito na

Patente U.S. 4.283.393. Métodos para produzir e utilizar dsRNA são conhecidos na arte. Um método compreende a transcrição simultânea de dois filamentos de DNA complementares, in vivo ou em uma única mistura de reação in vitro (Vide, p. ex., Patente U.S. 5.795.715). Em uma forma de realização, o dsRNA pode ser introduzido dentro de uma planta ou célula de planta diretamente por procedimentos de transformação padrão. Alternativamente, o dsRNA pode ser expresso em uma célula de planta transcrevendo-se dois RNAs complementares.

Outros métodos para a inibição da expressão genética endógena, tais como formação de hélice tripla (Moser et al., 1987, Science 238: 645-650 e Cooney et al., 1988, Science 241: 456-459) e co-supressão (Napoli et al., 1990, The Plant Cell 2: 279-289) são conhecidos na arte. Os cDNAs de comprimento total foram usados para a co-supressão dos genes de plantas endógenas (Vide, p. ex., Patentes U.S. Nos. 4.801.340, 5.034.323, 5.231.020, and 5.283.184; Van der Kroll et al., 1990, The Plant Cell 2: 291-299; Smith et al., 1990, Mol. Gen. Genetics 224: 477-481 e Napoli et al., 1990, The Plant Cell 2: 279-289).

Para supressão de sentido acredita-se que a introdução de um polinucleotídeo de sentido bloqueia a transcrição do correspondente gene alvo. O polinucleotídeo de sentido terá pelo menos 65% de identidade de seqüência com o gene ou RNA da planta alvo. Preferivelmente, a identidade percentual é de pelo menos 80%, 90%, 95% ou mais. O polinucleotídeo de sentido introduzido não precisa ser de comprimento total em relação ao gene ou transcrito alvo. Preferivelmente, o polinucleotídeo de sentido terá pelo menos 65% de identidade de seqüência com pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5. As regiões de identidade podem compreender introns e/ou exons e regiões não transladas. O polinucleotídeo de sentido introduzido pode estar presente na célula de planta transitoriamente ou pode ser estavelmente integrado dentro de

um cromossomo de planta ou replicon extracromossomal.

Alternativamente, a expressão genética de SRP pode ser inibida alvejando-se seqüências de nucleotídeo complementares à região reguladora de uma seqüência de nucleotídeo SRP (p. ex., um promotor e/ou intensificador SRP) para formar estruturais helicoidais triplas que evitem a transcrição de um gene de SRP em células alvo (Vide genericamente Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84; Helene et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; e Maher, 1992, *Bioassays* 14(12): 807-15).

Além dos ácidos nucleicos e polipeptídeos de SRP descritos acima, a presente invenção abrange estes ácidos nucleicos e polipeptídeos ligados a um componente. Estes componentes incluem mas não são limitados a componentes de detecção, componentes de hibridização, componentes de purificação, componentes de suprimento, componentes de reação, componentes de ligação e similares. Um grupo típico de ácidos nucleicos, tendo componentes ligados, são sondas e iniciadores. Sondas e iniciadores tipicamente compreendem um oligonucleotídeo substancialmente isolado. O oligonucleotídeo tipicamente compreende uma região da seqüência de nucleotídeo. O oligonucleotídeo tipicamente compreende uma região da seqüência de nucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas em pelo menos cerca de 12, preferivelmente cerca de 25, mais preferivelmente cerca de 40, 50, ou 75 nucleotídeos consecutivos de um filamento de sentido da seqüência exposta em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5; uma seqüência anti-sentido da seqüência exposta em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5; seus mutantes naturalmente ocorrentes. Iniciadores baseados em uma seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5 podem ser usados em reações PCR para clonar homólogos de SRP. As sondas baseadas nas seqüências de nucleotídeo de SRP podem ser usadas para detectar transcritos ou seqüências genômicas codificando os mesmos ou substancialmente idênticos polipeptídeos. Em formas de

realização preferidas, a sonda compreende ainda um grupo de rótulo ligado nela, p. ex., o grupo de rótulo pode ser um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator de enzima. Tais sondas podem ser usadas como parte de um kit de teste de marcador genômico para identificar células que expressam um SRP, tal como medindo-se um nível de um ácido nucleico codificando SRP, em uma amostra de células, p. ex., detectando os níveis de mRNA SRP ou determinando se um gene SRP genômico foi mutado ou deletado.

Em particular, um método útil para verificar o nível de transcrição do gene (um indicador da quantidade de mRNA disponível para translação para o produto genético) é realizar uma Northern blot (Para referência, vide, por exemplo, Ausubel et al., 1988, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nova Iorque). A informação de uma Northern blot demonstra pelo menos parcialmente o grau de transcrição do gene transformado. O RNA celular total pode ser preparado de células, tecidos ou órgãos por diversos métodos, todos bem conhecidos na arte, tais como aquele descrito em Bormann et al., 1992, *Mol. Microbiol.* 6: 317-326. Para avaliar a presença ou quantidade relativa de polipeptídeo traduzido deste mRNA, técnicas padrão, tais como Western blot, podem ser empregadas. Estas técnicas são bem conhecidas de uma pessoa de habilidade comum na arte (Vide, for exemplo, Ausubel et al., 1988, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nova Iorque).

A invenção provê ainda um vetor de expressão recombinante, compreendendo um ácido nucleico SRP como descrito acima, em que a expressão do vetor em uma célula hospedeira resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou limitadas por água e/ou tolerância aumentada a estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da célula hospedeira. Como aqui usado, o termo “vetor” refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro

ácido nucleico a que ela foi ligada. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que refere-se a uma alça de DNA de duplo filamento circular, dentro da qual segmentos adicionais de DNA podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados dentro do genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira dentro da qual eles são introduzidos (p. ex., vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos epissomais). Outros vetores (p. ex., vetores mamíferos não-epissomais) são integrados dentro do genoma de uma célula hospedeira na introdução dentro da célula hospedeira e, desse modo, são replicados juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de dirigir a expressão dos genes a que eles são operativamente ligados. Tais vetores são referidos aqui como “vetores de expressão”. Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante são com frequência na forma de plasmídeos. No presente relatório, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados intercambiavelmente visto que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. Entretanto, a invenção é destinada a incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (p. ex., retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados defeituosos em replicação), que atendem a funções equivalentes.

Os vetores de expressão recombinantes da invenção compreendem um ácido nucleico da invenção em uma forma adequada para expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira, o que significa que os vetores de expressão recombinantes incluem uma ou mais seqüências reguladoras, selecionadas com base nas células hospedeiras a serem usadas para expressão, que são operativamente ligadas a seqüência de ácido nucleico a ser expressa. Como aqui usado com respeito a um vetor de expressão recombinante, “operativamente ligada” é destinado a significar que a seqüência de nucleotídeo de interesse é ligada à(s) seqüência(s) reguladora(s)

de uma maneira que permite a expressão da seqüência de nucleotídeo (p. ex., em um sistema de transcrição/translação in vitro ou em uma célula hospedeira quando o vetor for introduzido dentro da célula hospedeira). A expressão “seqüência reguladora” é destinada a incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (p. ex., sinais de poliadenilação). Tais seqüências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) e Gruber e Crosby, em: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, eds. Glick and Thompson, Capítulo 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluindo referências ali. As seqüências reguladoras incluem aquelas que dirigem a expressão constitutiva de uma seqüência de ácido nucleico em muitos tipos de células hospedeiras e aquelas que dirigem a expressão da seqüência de nucleotídeo somente em certas células hospedeiras ou sob certas condições. Será observado por aqueles hábeis na arte que o projeto do vetor de expressão pode depender de tais 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 dentro da células hospedeiras para desse modo produzirem polipeptídeos ou peptídeos, incluindo polipeptídeos ou peptídeos de fusão, codificados por ácidos nucleicos como descrito aqui (p. ex., SRPs, formas mutantes de SRPs, polipeptídeos de fusão etc.

Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem ser projetados para expressão de SRPs em células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, os genes de SRP podem ser expressos em células bacterianas tais como *C. glutamicum*, células de inseto (usando-se vetores de expressão de baculovírus), células de levedura e outras fúngicas (Vide Romanos et al., 1992, Foreign gene expression in yeast: a review, Yeast 8: 423-488; van den Hondel et al., 1991, Heterologous gene expression in filamentous fungi, in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-

428: Academic Press: San Diego; and van den Hondelm and Punt, 1991, Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3): 239-251), ciliados dos tipos: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella, e Stylonychia, especialmente do gênero Stylonychia lemnae com vetores em seguida a um método de transformação como descrito no Pedido PCT No. WO 98/01572, e células de plantas multicelulares (Vide Schmidt e Willmitzer, 1988, High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants, Plant Cell Rep. 583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Capítulo 6/7, S.71-119, 1993; F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. Kung und R. Wu, 128-43, Academic Press: 1993; Potrykus, 1991, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42: 205-225 e referências citadas ali), ou células de mamíferos. Células hospedeiras adequadas são examinadas ainda em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press: San Diego, CA, 1990. Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito e translado in vitro, por exemplo, usando-se as seqüências reguladoras promotoras T7 e polimerase T7.

A expressão dos polipeptídeos em procariotos é mais freqüentemente realizada com vetores contendo promotores constitutivos ou indutivos dirigindo a expressão dos polipeptídeo de fusão ou não-fusão. Os vetores de fusão adicionam numerosos Aminoácidos a um polipeptídeo codificado ali, usualmente ao término amino do polipeptídeo recombinante, porém também ao término-C ou fundido dentro de regiões adequadas dos

polipeptídeos. Tais vetores de fusão tipicamente servem a três finalidades: 1) aumentar a expressão de um polipeptídeo recombinante; 2) aumentar a solubilidade de um polipeptídeo recombinante; e 3) auxiliar na purificação de um polipeptídeo recombinante pela atuação como um ligando em purificação de afinidade. Com frequência, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítico é introduzido na junção do componente de fusão e do polipeptídeo recombinante, para possibilitar a separação do polipeptídeo recombinante do componente de fusão subsequente à purificação do polipeptídeo de fusão. Tais enzimas e suas seqüências de reconhecimento cognatas, incluem o Fator Xa, trombina e enterocinase.

Os vetores de expressão de fusão típicos incluem pGEX (Farmacia Biotech Inc; Smith e Johnson, 1988, Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Farmacia, Piscataway, NJ) que fundem a glutathione S-transferase (GST), polipeptídeo de ligação de maltose E ou polipeptídeo A, respectivamente, ao polipeptídeo recombinante alvo. Em uma forma de realização, a seqüência de codificação do SRP é clonada em um vetor de expressão pGEX, para criar um vetor codificando um polipeptídeo de fusão compreendendo, do término-N ao término-C, polipeptídeo do sítio-X de clivagem GST-trombina. O polipeptídeo de fusão pode ser purificado por cromatografia de afinidade usando-se resina de glutathione-agarose. O SRP não-fundido a GST pode ser recuperado por clivagem do polipeptídeo de fusão com trombina.

Exemplos de vetores de expressão de E. coli de não-fusão indutíveis incluem pTrc (Amann et al., 1988, Gene 69: 301-315) e pET 11d (Studier et al., 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 60-89). A expressão genética alvo do vetor pTrc baseia-se na transcrição de polimerase de RNA hospedeiro de um promotor de fusão trp-lac híbrido. A expressão genética do vetor pET 11d baseia-se na transcrição de um promotor de fusão gn10-lac T7 mediado

por uma polimerase de RNA viral co-expressa (T7 gn1). Esta polimerase viral é suprida pelas cepas hospedeiras BL21(de3) ou HMS174(DE3) de um profago λ residente abrigando um gene gn1 T7 sob o controle transcricional do promotor lacUV 5.

5 Uma estratégia para maximizar a expressão de polipeptídeo recombinante é expressar o polipeptídeo em uma bactéria hospedeira com uma capacidade deteriorada de proteoliticamente clivar o polipeptídeo recombinante (Gottesman, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 119-128). Outra
10 estratégia é alterar a seqüência do ácido nucleico a ser inserido em um vetor de expressão, de modo que o códons individuais para cada Aminoácido sejam aqueles preferencialmente utilizados na bactéria escolhida para expressão, tal como *C. glutamicum* (Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118). Tal alteração das seqüências de ácido nucleico da invenção pode ser realizada
15 por técnicas de síntese de DNA padrão.

Em outra forma de realização, o vetor de expressão de SRP é um vetor de expressão de levedura. Exemplos de vetores para expressão em levedura de *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari, et al., 1987, EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan e Herskowitz, 1982, Cell 30: 933-943), pJRY88
20 (Schultz et al., 1987, Gene 54: 113-123), e pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vetores e métodos para a construção de vetores apropriados para uso em outros fungos, tais como os fungos filamentosos, incluem aqueles detalhados em: van den Hondel and Punt, 1991, "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi," em: Applied Molecular Genetics
25 of Fungi, Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, os SRPs são expressos em plantas e células de plantas, tais como células de plantas unicelulares (p. ex., algas) (Vide Falciatore et al., 1999, Marine

Biotechnology 1(3): 239-251 e referências ali citadas) e células de planta de plantas superiores (p. ex., os espermatófitos, tais como plantas de cultura). Um SRP pode ser “introduzido” em uma célula de planta por meios incluindo transfecção, transformação ou transdução, eletroporação, bombardeio de partículas, agoinfecção e similares. Um método de transformação conhecido daqueles hábeis na arte é a imersão de uma planta florescendo dentro de uma solução de Agrobactéria, em que a Agrobactéria contém o ácido nucleico de SRP, seguido por reprodução dos gametas transformados.

Outros métodos adequados para transformar ou transfectar as células hospedeiras, incluindo células de plantas, podem ser encontrados em Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Última ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, e outros manuais de laboratório, tais como Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, Nova Jérsei. Como tolerância ao estresse biótica e abiótica é uma característica geral que se deseja seja herdada em uma larga variedade de plantas como milho, trigo, centeio, aveia, triticale, arroz, cevada, soja, amendoim, algodão, colza, canola, mandioca, pimenta, girassol, tagetes, plantas sonaláceas como batata, tabaco, berinjela e tomate, Vicia species, ervilha, alfalfa, plantas arbusto (café, cacau, chá), Salix species, árvores (palmeira oleosa, coco), gramas perenes e culturas de forragem, estas plantas de cultura são também plantas alvo preferidas para uma engenharia genética como mais uma forma de realização da presente invenção. Culturas de forragem incluem mas não são limitadas a *Wheatgrass*, *Canarygrass*, *Bromegrass*, *Wildrye Grass*, *Bluegrass*, *Orchardgrass*, alfalfa, *salfoin*, *Birdsfoot Trefoil*, *Alsike Clover*, Trevo vermelho e trevo de cheiro. Em uma forma de realização da presente invenção, a transfecção de um SRP dentro de uma planta é conseguida por transferência de gene mediada por Agrobactéria. A transformação de planta mediada por agrobacterium pode ser realizada

usando-se, por exemplo, a cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(pMP90) (Koncz e Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204: 383-396) ou LBA4404 (Clontech). A transformação pode ser realizada por técnicas de transformação e regeneração padrão (Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids Res. 13: 4777-4788; Gelvin, Stanton, Schilperoort, e Robert, Plant Molecular Biology Manual, 2^a Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., set. de 1995, Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard, Thompson, e John, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). For exemplo, a colza pode ser transformada via transformação de cotilédone ou hipocótilo (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8: 238-242; De Block et al., 1989, Plant Physiol. 91: 694-701). O uso de antibióticos para *Agrobacterium* e seleção de planta depende do vetor binário e da cepa *Agrobacterium* usada para transformação. A seleção de colza é normalmente realizada usando-se canamicina como marcador de planta selecionável. A transferência genética mediada por *Agrobacterium* para linho pode ser realizada usando-se, por exemplo, uma técnica descrita por Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report 13:282-285. Adicionalmente, a transformação de soja pode ser realizada usando-se, por exemplo, uma técnica descrita na Patente Européia No. 0424 047, Patente U.S. 5.322.783, Patente Européia No. 0397 687, Patente U.S. 5.376.543 ou Patente U.S. 5.169.770. A transformação de milho pode ser realizada por bombardeio de partícula, absorção de DNA mediada por polietileno glicol ou via a técnica de fibra de carbeto de silício (Vide, for exemplo, Freeling e Walbot "The Maize Handbook" Springer Verlag: Nova Iorque, 1993, ISBN 3-540-97826-7). Um exemplo específico de transformação de milho é encontrado na Patente U.S. 5.990.387 e um exemplo específico de transformação de trigo pode ser encontrado no Pedido PCT No. WO 93/07256.

De acordo com a presente invenção, o SRP introduzido pode

ser mantido na célula de planta estavelmente se for incorporado dentro de um replicon autônomo cromossomal ou integrado dentro dos cromossomos da planta. Alternativamente, o SRP introduzido pode estar presente em um vetor não-replicante extra-cromossomal e pode ser passageiramente expresso ou transitoriamente ativo.

Em uma forma de realização, um microorganismo recombinante homólogo pode ser criado em que o SRP é integrado dentro de um cromossoma, um vetor é preparado que contém pelo menos uma parte de um gene de SRP, dentro do qual uma deleção, adição ou substituição foi introduzida para, desse modo, alterar, p. ex., funcionalmente romper, o gene de SRP. Preferivelmente, o gene de SRP é um gene SRP *P. patens*, *G. max*, *T. aestivum* ou *B. napus* SRP, mas pode ser um homólogo de uma planta relacionada ou mesmo de uma fonte de mamífero, levedura ou inseto. Em uma forma de realização, o vetor é projetado de modo que, na recombinação homóloga, o gene de SRP endógeno seja funcionalmente rompido (isto é, não mais codifica um polipeptídeo funcional; também referido como um vetor silenciado). Alternativamente, o vetor pode ser projetado de modo que, na recombinação homóloga, o gene de SRP endógeno seja mutado ou de outro modo alterado, porém ainda codifique um polipeptídeo funcional (p. ex., a região reguladora a montante pode ser alterada para, desse modo, alterar a expressão do SRP endógeno). Para criar uma mutação pontual via recombinação homóloga, podem ser usados híbridos de DNA-RNA em uma técnica conhecida como quimeroplastia (Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5): 1323-1330 e Kmiec, 1999, *Gene Therapy American Scientist*, 87(3): 240-247). Os procedimentos de recombinação homóloga de *P. patens*, *G. max*, *T. aestivum*, ou *B. napus* são também bem conhecidos na arte e são contemplados para uso aqui.

Visto que no vetor recombinante homólogo a parte alterada do gene SRP é flanqueada em suas extremidades 5' e 3' por uma molécula de

ácido nucleico adicional do gene SRP, para permitir que recombinação homóloga ocorra entre o gene SRP exógeno transportado pelo vetor e um gene SRP endógeno, de um microorganismo ou planta. A molécula de ácido nucleico de SRP flanqueante adicional é de suficiente comprimento para recombinação homóloga bem sucedida com o gene endógeno. Tipicamente, diversas centenas de pares de base até quilobases de DNA flanqueante (tanto nas terminações 5' como 3') são incluídas no vetor (Vide, p. ex., Thomas e Capecchi, 1987, Cell 51: 503 para uma descrição de vetores de recombinação homólogos ou Strepp et al., 1998, PNAS, 95 (8): 4368-4373 para recombinação baseada em cDNA de *P. patens*). O vetor é introduzido em um microorganismo ou célula de planta (p. ex., via DNA mediado por polietileno glicol) e as células em que o gene SRP introduzido recombinau homologamente com o gene SRP endógeno são selecionadas empregando-se técnicas conhecidas na arte.

Em outra forma de realização, podem ser produzidos microorganismos recombinantes que contêm sistemas selecionados que permitem expressão regulada do gene introduzido. Por exemplo, a inclusão de um gene SRP em um vetor colocando-o sob controle do operon lac permite a expressão do gene SRP somente na presença de IPTG. Tais sistemas reguladores são bem conhecidos na arte.

Quer presente em um vetor não-replicante extra-cromossomal quer em um vetor que seja integrado dentro de um cromossoma, o polinucleotídeo de SRP preferivelmente reside em um cassete de expressão de planta. Um cassete de expressão de planta preferivelmente contém seqüências reguladoras capazes de acionar a expressão genética em células de planta que são operativamente ligadas, de modo que cada seqüência pode cumprir sua função, por exemplo, terminação da transcrição por sinais de poliadenilação. Sinais de poliadenilação preferidos são aqueles originando-se de *Agrobacterium tumefaciens* t-DNA, tais como o gene 3 conhecido como

octopino sintase do plasmídeo-Ti pTiACH5 (Gielen et al., 1984, EMBO J. 3: 835) ou seus equivalentes funcionais, porém também todos os outros terminadores funcionalmente ativos de plantas são adequados. Como a expressão genética das plantas é muito freqüentemente não limitada em níveis transcrpcionais, um cassete de expressão de planta preferivelmente contém outras seqüências operativamente ligadas, como intensificadores translacionais, tais como a seqüência de sobremarcha contendo a seqüência líder não-transladada-5' do vírus mosaico do tabaco, aumentando a relação de polipeptídeo por RNA (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693-8711). Exemplos de vetores de expressão de planta incluem aqueles detalhados em: Becker, Kemper, Schell e Masterson, 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197; e Bevan, 1984, Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung and Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

A expressão genética deve ser operativamente ligada a um promotor apropriado, conferindo expressão genética em um maneira conveniente, específica de célula ou específica de tecido. Promotores úteis nos cassetes de expressão da invenção incluem qualquer promotor que seja capaz de iniciar a transcrição em uma célula de planta. Tais promotores incluem mas não são limitados àqueles que podem ser obtidos de plantas, vírus de plantas e bactérias que contêm genes que são expressos em plantas, tais como Agrobacterium e Rhizobium.

O promotor pode ser constitutivo, indutível, preferido em estágio desenvolvimentista, preferido em tipo de célula, preferido em tecido ou preferido em órgão. Os promotores constitutivos são ativos sob a maioria das condições. Exemplos de promotores constitutivos incluem os promotores CaMV 19S e 35 S (Odell et al., 1985, Nature 313: 810-812), o promotor sX

CaMV 35S (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 Arabidopsis, o promotor ubiquitino (Christensen et al., 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675-689), pEmu (Last et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81: 581-588), o promotor do vírus mosaico figwort 35S promoter, o promotor Smas (Velten et al., 1984, EMBO J 3: 2723-2730), o promotor GRP1-8, o super promotor (Patente U.S. 5.955.646), o promotor da cinamil álcool desidrogenase (Patente U.S. 5.683.439), promotores do T-DNA de Agrobacterium, tais como manopino sintase, nopalina sintase e octopino sintase, o promotor da pequena subunidade da ribulose bifosfato carboxilase (ssuRUBISCO), e similares.

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 patogênico, condições anaeróbicas e similares. Por exemplo, o promotor hsp80 de Brassica é induzido por choque térmico; o promotor PPDK é induzido pela luz; o promotor PR-1 do tabaco, Arabidopsis, e moinho são indutíveis por infecção com um patógeno; e o promotor Adh1 é induzido por hipoxia e estresse de frio. A expressão genética da planta pode também ser facilitada via um promotor indutível (para uma recapitulação, vide Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89-108). Os promotores quimicamente indutíveis são especialmente adequados se a expressão genética for desejada ocorrer em uma maneira específica de tempo. Exemplos de tais promotores são um promotor indutível por ácido salicílico (Pedido PCT No. WO 95/19443), um promotor indutível por tetraciclina (Gatz et al., 1992, Plant J. 2: 397-404), e um promotor indutível por etanol (Pedido PCT No. WO 93/21334).

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, o promotor indutível é um promotor indutível por estresse. Para fins da

invenção, os promotores indutíveis por estresse são preferencialmente ativos sob um ou mais dos seguintes estresses: condições sub-ótimas associadas com estresses de salinidade, seca, temperatura, produto químico, patogênico e oxidativo. os promotores indutíveis incluem mas não são

5 limitados a Cor78 (Chak et al., 2000, *Planta* 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; Nylander et al., 2001, *Plant Mol. Biol.* 45: 341-52; Navarre and Goffeau, 2000, *EMBO J.* 19: 2515-24; Capel et al., 1997, *Plant Physiol.* 115: 569-76),

10 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 and 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, GenBank Accession # L22302, and Pedido PCT No. WO 97/20057), PtxA (Plesch et al., GenBank Accession # 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

20 patógeno (Ward et al., 1993, *Plant. Mol. Biol.* 22: 361-366), o promotor-hsp80 indutível por calor do tomate (Patente U.S. 5187267), promotor da alfa-amilase indutível por 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

25 promotor RD29A, Vide Yamaguchi-Shinozaki et al., 1993, *Mol. Gen. Genet.* 236:331-340.

Os promotores preferidos do estágio evolucionário são preferencialmente expressos em certos estágio do desenvolvimento. Os promotores preferidos de tecido e órgão incluem aqueles que são

preferencialmente expressos em certos tecidos ou órgãos, tais como folhas, raízes, sementes ou xilem. 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 de homem, preferidos de semente, preferidos de integumento, preferidos de tubérculo, preferidos de pedículo, preferidos de pericarpo e preferidos de folha, preferidos de estigma, preferidos de pólen, preferidos de antera, preferidos de pétala, preferidos de sépala, preferidos de pedicelo, preferidos de silíqua, preferidos de caule, preferidos de raiz e similares. Os promotores preferidos de semente são preferencialmente expressos durante o desenvolvimento da semente e/ou germinação. Por exemplo, os promotores preferidos de semente podem ser preferidos de embrião, preferidos de endosperma e preferidos de revestimento de semente (Vide Thompson et al., 1989, BioEssays 10:108). Exemplos de promotores preferidos de semente incluem mas não são limitados a celulose sintase (ceIA), Cim1, gama-zeína, globulina-1, maize 19 kD zeína (cZ19B1) e similares.

Outros promotores preferidos de tecido ou preferidos de órgão incluem o promotor gene-napin de colza (Patente U.S. 5.608.152) o promotor-*USP* de *Vicia faba* (Baeumlein et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 225(3): 459-67), the o promotor-oleosin de *Arabidopsis* (Pedido PCT No. WO 98/45461), o promotor faseolin de *Faseolus vulgaris* (Patente U.S. 5.504.200), o promotor Bce4 de *Brassica* (Pedido PCT No. WO 91/13980) ou o promotor legumin B4 (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2): 233-9), bem como os promotores conferindo expressão específica de semente em plantas monocotiledônea como milho, cevada, trigo, centeio, arroz etc. Promotores adequados para citar são o promotor do gene *lpt2* ou *lpt1* da cevada (Pedido PCT No. WO 95/15389 e Pedido PCT No. WO 95/23230) ou aqueles descritos no Pedido PCT No. WO 99/16890 (promotores do gene-hordein da cevada, gene glutelin do arroz, gene oryzin do arroz, gene prolamin do arroz,

gene gliadin do trigo, gene glutelin do trigo, gene glutelin da aveia, gene casirin do Sorgo e gene secalin do arroz).

Outros promotores úteis nos cassetes de expressão da invenção incluem mas não são limitados ao principal promotor da proteína de libação da clorofila a/b, promotores da histona, promotor de Ap3, promotor da β -conglucina, promotor da napina, o promotor da lectina da soja, o promotor da zeína 15kD do milho, o promotor da zeína 22kD, o promotor da zeína 27kD, o promotor da zeína- γ , os promotores cerosos shrunken 1, shrunken 2 e bronze, o promotor Zm13 (Patente U.S. 5.086.169), os promotores de poligalacturonase do milho (PG) (Patentes U.S. Nos. 5,412,085 e 5,545,546), e o promotor SGB6 (Patente U.S. 5.470.359), bem como promotores sintéticos ou outros naturais.

Flexibilidade adicional no controle da expressão genética heteróloga em plantas pode ser obtida utilizando-se domínios de ligação de DNA e elementos de resposta de fontes heterólogas (isto é, domínios de ligação de DNA de fontes não de plantas). Um exemplo de tal domínio de ligação de DNA heterólogo é o domínio de ligação de DNA LexA (Brent and Ptashne, 1985, Cell 43: 729-736).

A invenção fornece ainda um vetor de expressão recombinante compreendendo uma molécula de DNA SRP da invenção clonada dentro do vetor de expressão em uma orientação antissentido. Isto é, a molécula de DNA é operativamente ligada a uma seqüência reguladora de uma maneira que permita a expressão (por transcrição da molécula de DNA) de uma molécula de RNA que seja antissentido a um SRP mRNA. Podem ser escolhidas as seqüências reguladoras, operativamente ligadas a uma molécula de ácido nucleico clonada na orientação antissentido, que dirigem a expressão contínua da molécula de RNA antissentido em uma variedade de tipos de célula. Por exemplo, os promotores e/ou intensificadores virais, ou seqüências reguladoras, que dirigem a expressão constitutiva, específica de tecido ou

específica de tipo de célula do RNA antissentido, podem ser escolhidas. O vetor de expressão antissentido pode ser na forma de um plasmídeo, fagemídeo o vírus atenuado recombinante, em que os ácidos nucleicos antissentido são produzidos sob o controle de uma região reguladora de alta eficiência. A atividade da região reguladora pode ser determinada pelo tipo de célula dentro da qual o vetor é introduzido. Para um exame da regulação da expressão genética empregando genes antissentido, vide Weintraub, H. et al., 1986, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1), and Mol et al., 1990, FEBS Letters 268: 427-430.

Outro aspecto da invenção pertence a células hospedeiras dentro das quais um vetor de expressão recombinante da invenção foi introduzido. As expressões “célula hospedeira” e “célula hospedeira recombinante” são usados intercambiavelmente aqui. Entende-se que tais expressões referem-se somente à célula assunto particular, porém elas também se aplicam à progênie ou progênie particular de tal célula. Em razão de certas modificações poderem ocorrer em gerações sucessivas devido a influências de mutação ou ambientais, tal progênie não pode, de fato, ser idêntica à célula precursora, porém é ainda incluída dentro do escopo da expressão como aqui usada. Uma célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um SRP pode ser expresso em células bacterianas tais como *C. glutamicum*, células de insetos, células fúngicas ou células mamíferas (tais como células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células COS), algas, ciliados, células de planta, fungos ou outros microorganismos como *C. glutamicum*. Outras células hospedeiras são conhecidas daqueles hábeis na arte.

Uma célula hospedeira da invenção, tal como uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica em cultura, pode ser usada para produzir (isto é, expressar) um SRP. Portanto, a invenção fornece ainda

métodos para produzir um SRP empregando-se as células hospedeiras da invenção. Em uma forma de realização, o método compreende cultivar a célula hospedeira da invenção (dentro da qual um vetor de expressão recombinante codificando um SRP foi introduzido ou dentro de cujo genoma foi introduzido um gene codificando um SRP tipo selvagem ou alterado) em um meio adequado, até o SRP ser produzido. Em outra forma de realização, o método compreende ainda isolar um SRP do meio ou da célula hospedeira.

Outro aspecto da invenção pertence a um SRP isolado e suas partes biologicamente ativas. Um polipeptídeo “isolado” ou “purificado” ou sua parte biologicamente ativa é livre de parte do material celular quando produzido por técnicas de DNA recombinante ou precursores químicos ou outros químicos quando quimicamente sintetizados. A linguagem “substancialmente livre de material celular” inclui preparações de um SRP em que o polipeptídeo é separado de alguns dos componentes celulares das células em que é naturalmente ou recombinantemente produzido. Em uma forma de realização, a linguagem “substancialmente livre de material celular” inclui preparações de um SRP tendo menos do que cerca de 30 % (em peso seco) de material não-SRP (também referido aqui como um “polipeptídeo contaminante”), mais preferivelmente menos do que cerca de 20% de material não-SRP, ainda mais preferivelmente menos do que cerca de 10% de material não-SRP, e muitíssimo preferivelmente menos do que cerca de 5% de material não-SRP.

Quando o SRP ou sua parte biologicamente ativa é recombinantemente produzido, ele é também preferivelmente livre substancialmente de meio de cultura, isto é, o meio de cultura representa menos do que cerca de 20%, mais preferivelmente menos do que cerca de 10%, e muitíssimo preferivelmente menos do que cerca de 5% do volume da preparação de polipeptídeo. A linguagem “substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos” inclui preparações de SRP em que

o polipeptídeo é separado dos precursores químicos ou outros químicos que são envolvidos na síntese do polipeptídeo. Em uma forma de realização, a linguagem “substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos” inclui preparações de um SRP tendo menos do que cerca de 30% (em peso seco) de precursores químicos ou químicos não-SRP, mais preferivelmente menos do que cerca de 20% de precursores químicos ou químicos não-SRP, ainda mais preferivelmente menos do que cerca de 10% de precursores químicos ou químicos não-SRP e muitíssimo preferivelmente menos do que cerca de 5% de precursores químicos ou químicos não-SRP.

Em formas de realização preferidas, os polipeptídeos isolados, ou suas partes biologicamente ativas, não têm polipeptídeos contaminantes do mesmo organismo de que o SRP é derivado. Tipicamente, tais polipeptídeos são produzidos por expressão recombinante de, por exemplo, um SRP de *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum* em plantas que não *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum*, ou microorganismos tais como *C. glutamicum*, ciliados, algas ou fungos.

As moléculas de ácido nucleico, polipeptídeos, homólogos de polipeptídeo, polipeptídeos de fusão, iniciadores, vetores e células hospedeiras descritas aqui podem ser usadas em um ou mais dos seguintes métodos; identificação de *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum* e organismos relacionados; mapeamento de genomas de organismos relacionados com *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum*; identificação e localização de seqüências *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum* de interesse; estudos evolucionários; determinação de regiões de SRP requeridas para função; modulação de uma atividade SRP; modulação do metabolismo de uma ou mais funções celulares; modulação do transporte de transmembrana de um ou mais compostos; modulação do crescimento sob condições limitadas pela água; modulação da resistência ao estresse; e modulação da expressão dos ácidos nucleicos de SRP.

O musgo *P. patens* é relacionado com outros musgos tais como *Ceratodon purpureus*, que são capazes de crescimento na ausência de luz. Musgos como *Ceratodon* e *Physcomitrella* compartilham um alto grau de identidade de sequência na sequência de DNA e o nível de polipeptídeo permitindo o uso de seleção heteróloga de moléculas de DNA com sondas evoluindo de outros musgos ou organismos, assim possibilitando a derivação de uma sequência de consenso adequada para seleção heteróloga ou anotação e predição funcionais das funções genéticas em terceiras espécies. A capacidade de identificar tais funções pode, portanto, ter relevância significativa, p. ex., predição de especificidade de substrato das enzimas. Além disso, estas moléculas de ácido nucleico podem servir como pontos de referência para o mapeamento dos genomas de musgo ou de genomas de organismos relacionados.

As moléculas de ácido nucleico de SRP da invenção têm uma variedade de usos. Muitíssimo importante, as sequências de ácido nucleico e Aminoácidos da presente invenção podem ser usadas para transformar plantas, desse modo aumentando o crescimento da planta e/ou induzindo tolerância a estresses tais como seca, alta salinidade e frio. A presente invenção, portanto, provê uma planta transgênica transformada por um ácido nucleico SRP, em que a expressão da sequência de ácido nucleico na planta resulta no aumentado crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade de planta tipo selvagem. A planta transgênica pode ser uma monocotiledônea ou uma dicotiledônea. A invenção provê ainda que a planta transgênica pode ser selecionada de milho, trigo, centeio, aveia, triticale, arroz, cevada, soja, amendoim, algodão, colza, canola, mandioca, pimenta, girassol, tagete, plantas solanáceas, batata, tabaco, berinjela, tomate, *Vicia species*, ervilha, alfafa, cacau, chá, *Salix species*, dedenheiro, coco, grama perene e culturas de forragem, por exemplo.

Em particular, a presente invenção descreve a utilização da expressão de PpAKT-3 de *P. patens*; GmAKT-2 de *G. max*, e TaAKT-1 de *T. aestivum* para construir plantas tolerantes à seca, tolerantes ao sal e/ou tolerantes ao frio e/ou plantas com aumentado crescimento sob condições normais ou de estresse. Esta estratégia foi aqui demonstrada para *A. thaliana*, porém sua aplicação não é restringida a esta planta. Portanto, a invenção fornece uma planta transgênica contendo um SRP, tal como o PpAKT-3 como definido na SEQ ID NO:2, GmAKT-2 como definido na SEQ ID NO:4, ou TaAKT-1 como definido na SEQ ID NO:6, em que a planta tem aumentado crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou uma aumentada tolerância a um estresse ambiental selecionado de um ou mais do grupo consistindo seca, sal aumentado ou temperatura aumentada ou diminuída. Em formas de realização, o estresse ambiental é seca ou temperatura diminuída.

Portanto, a invenção fornece um método para produzir uma planta transgênica com um ácido nucleico codificando SRP, em que a expressão do(s) ácido(s) nucleico(s) na planta resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou limitadas pela água e/ou tolerância aumentada a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta compreendendo: (a) introduzir dentro de uma célula de planta um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico de SRP, em que a expressão do(s) ácido(s) nucleico(s) da planta resulta no aumentado crescimento da planta sob condições normais ou limitadas pela água e/ou aumentada tolerância a um estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta, compreendendo: (a) introduzir dentro de uma célula de planta um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico SRP e (b) gerar da célula de planta uma planta transgênica com aumentado crescimento sob condições normais ou limitadas por água e/ou aumentada tolerância ao estresse ambiental, em

comparação com uma variedade tipo selvagem da planta. A célula de planta inclui mas não é limitada a um protoplasto, célula produtora de gameta e uma célula que regenere em uma planta integral. Como aqui usado, o termo “transgênico” refere-se a qualquer planta, célula de planta, calosidade, tecido de planta ou parte de planta, que contenha todo ou parte de pelo menos um polinucleotídeos SRP recombinante. Em muitos casos, todo ou parte do polinucleotídeos recombinante é estavelmente integrado em um cromossoma ou elemento cromossomal extra-estável, de modo que ele é passado para gerações sucessivas. Em formas de realização preferidas, o ácido nucleico SRP codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

A presente invenção também fornece um método de modular o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou modular uma tolerância da planta a um estresse ambiental, compreendendo modificar a expressão de um ácido nucleico codificando o SRP na planta. O crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância ao estresse ambiental pode ser conseguido aumentando-se ou diminuindo-se a expressão de um SRP, respectivamente. Preferivelmente, o crescimento da planta sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância ao estresse ambiental é aumentado aumentando-se a expressão de um SRP. A expressão de um SRP pode ser modificada por qualquer método conhecido daqueles hábeis na arte. Os métodos de aumentar a expressão dos SRPs podem ser usados, em que a planta é transgênica ou não-transgênica. Nos casos em que a planta é transgênica, a planta pode ser transformada com um vetor contendo qualquer um dos ácidos nucleicos codificantes de SRP descritos acima ou a planta pode ser transformada com um promotor que dirija a expressão de um SRP nativo da planta, por exemplo. A invenção provê que tal promotor pode ser preferido de tecido, regulado evolutivamente, indutível de estresse ou uma combinação deles. Alternativamente, as plantas não-transgênicas podem ter a

expressão do SRP modificada induzindo-se um promotor nativo. A expressão de PpAKT-3 como definido na SEQ ID NO:1, GmAKT-2 como definido na SEQ ID NO:3, ou TaAKT-1 como definido na SEQ ID NO:5 em plantas alvo pode ser realizada por um dos seguintes exemplos, porém não limitado a eles:

5 (a) promotor constitutivo, (b) promotor indutível de estresse, (c) promotor induzido por químico e (d) superexpressão de promotor construído com, por exemplo, fatores de descrição derivados de ligador de zinco (Greisman and Pabo, 1997, Science 275: 657).

Em uma forma de realização preferida, a transcrição do SRP é modulada usando-se fatores de transcrição derivados de ligador de zinco (ZFPs) como descrito em Greisman e Pabo, 1997, Science 275: 657 e manufaturados por by Sangamo Biosciences, Inc. Estes ZFPs compreendem tanto um domínio de reconhecimento de DNA como um domínio funcional que causa ativação ou repressão de um ácido nucleico alvo, tal como um
10 ácido nucleico SRP. Portanto, a ativação e repressão dos ZFPs podem criadas que reconhecem especificamente os promotores de SRP descritos acima e usados para aumentar ou diminuir a expressão de SRP em uma planta, desse modo modulando o crescimento e/ou a tolerância a estresse da planta. A presente invenção também inclui identificação dos homólogos de PpAKT-3
15 como definido na SEQ ID NO:1, GmAKT-2 como definido na SEQ ID NO:3 e TaAKT-1 como definido na SEQ ID NO:5 em uma planta alvo, bem como o promotor do homólogo. A invenção também provê um método de aumentar a expressão de um gene de interesse dentro de uma célula hospedeira, em comparação com uma variedade tipo selvagem da célula hospedeira, em que o
20 gene de interesse é transcrito em resposta a um SRP, compreendendo: (a) transformar a célula hospedeira com um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico codificando SRP e (b) expressar o SRP dentro da célula hospedeira, desse modo aumentando a expressão do gene transcrito em resposta ao SRP, quando comparado com uma variedade tipo selvagem da
25

célula hospedeira.

Além de introduzir a seqüência de ácido nucleico SRP dentro das plantas transgênicas, esta seqüência pode também ser usada para identificar um organismo como sendo *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum*, ou um seu parente próximo. Ela pode também ser usada para identificar a presença de *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum* ou um seu parente em uma população misturada de microorganismos. A invenção provê a seqüência de ácido nucleico de *P. patens*, *G. max*, e *T. aestivum* genes; sondando-se o DNA genômico extraído de uma cultura de uma população única ou misturada de microorganismos sob condições rigorosas com uma sonda abarcando uma região de um gene *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum* que é único para este organismo, pode-se verificar se este organismo está presente.

Além disso, o ácido nucleico e as moléculas de polipeptídeo da invenção podem servir como marcadores para regiões específicas do genoma. Isto tem utilidade não somente no mapeamento do genoma, mas também em estudos funcionais de polipeptídeos de *P. patens*, *G. max*, ou *T. aestivum*. Por exemplo, para identificar a região do genoma a que um polipeptídeo de ligação de DNA de *P. patens* se liga, o genoma de *P. patens* poderia ser digerido e os fragmentos incubados com o polipeptídeo de ligação de DNA. Esses fragmentos que se ligam ao polipeptídeo podem ser adicionalmente sondados com as moléculas de ácido nucleico da invenção, preferivelmente com rótulos prontamente detectáveis. A ligação de uma tal molécula de ácido nucleico ao fragmento do genoma possibilita a localização do fragmento do mapa do genoma de *P. patens* e, quando realizada múltiplas vezes com diferentes enzimas, facilita uma rápida determinação da seqüência de ácido nucleico a que o polipeptídeo se liga. Outrossim, as moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser suficientemente idênticas às seqüências das espécies relacionadas, de modo que estas moléculas de ácido nucleico podem servir como marcadores para a construção de um mapa genômico em musgos

aparentados.

As moléculas de ácido nucleico de SRP da invenção são também úteis para estudos estruturais evolucionários e de polipeptídeo. Os processos metabólicos e de transporte em que as moléculas da invenção participam são utilizados por uma larga variedade de células procarióticas ou eucarióticas; comparando-se as seqüências das moléculas de ácido nucleico da presente invenção com aquelas codificando enzimas similares de outros organismos, o parentesco evolucionário dos organismos pode ser avaliado. Similarmente, uma tal comparação permite uma avaliação de que regiões da seqüência são conservadas e quais não são, o que pode auxiliar na determinação daquelas regiões do polipeptídeo que são essenciais para o funcionamento da enzima. Este tipo de determinação é de valor para estudos de engenharia de polipeptídeo e pode fornecer uma indicação de o que o polipeptídeo pode tolerar em termos de mutagênese, sem perder sua função.

A manipulação das moléculas de ácido nucleico de SRP da invenção pode resultar na produção de SRPs tendo diferenças funcionais dos SRPs tipo selvagem. Estes polipeptídeos podem ter sua eficiência ou atividade melhoradas, podem estar presentes em maiores números na célula do que é usual ou podem ter sua eficiência ou atividade diminuídas.

O efeito da modificação genética em plantas, *C. glutamicum*, fungos, algas ou ciliados na tolerância ao estresse pode ser avaliado cultivando-se os microorganismo ou planta modificado sob condições abaixo das adequadas e então analisando-se as características de crescimento e/ou metabolismo da planta. Tais técnicas de análise são bem conhecidas de uma pessoa hábil na arte e incluem peso seco, peso úmido, síntese do polipeptídeo, síntese de carboidrato, síntese lipídica, taxas de evapotranspiração, produção geral da planta e/ou cultura, florescência, reprodução, fixação da semente, crescimento da raiz, taxas de respiração, taxas de fotossíntese etc. (Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in

Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm et al., 1993, Biotechnology, vol. 3, Chapter III: Product recovery and purification, page 469-714, VCH: Weinheim; Belter et al., 1988, Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy and Cabral, 1992, Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz e Henry, 1988, Biochemical separations, in: Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, Chapter 11, page 1-27, VCH: Weinheim; and Dechow, 1989, Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Por exemplo, os vetores de expressão de levedura compreendendo os ácidos nucleicos descritos aqui, ou seus fragmentos, podem ser construídos e transformados em *Saccharomyces cerevisiae* usando-se protocolos padrão. As células transgênicas resultantes podem então ser ensaiadas quanto a falha ou alteração de sua tolerância a estresses de seca, sal e temperatura. Similarmente, os vetores de expressão das plantas, compreendendo os ácidos nucleicos descritos aqui, ou seus fragmentos, podem ser construídos e transformados em uma apropriada célula de planta, tal como *Arabidopsis*, soja, colza, milho, trigo, *Medicago truncatula* etc., usando-se protocolos padrão. As células transgênicas resultantes e/ou plantas derivadas delas podem então ser ensaiadas quanto a falha ou alteração de sua tolerância a estresses de seca, sal e temperatura.

A engenharia de um ou mais genes de SRP da invenção pode também resultar em SRPs tendo alteradas atividades, o que indiretamente impacta a resposta ao estresse e/ou a tolerância ao estresse de algas, plantas, ciliados ou fungos ou outros microorganismos como *C. glutamicum*. Por exemplo, os processos bioquímicos normais do metabolismo resulta na produção de uma variedade de produtos (p. ex., peróxido de hidrogênio e outras espécies de oxigênio reativas), o que pode ativamente interferir com estes mesmos processos metabólicos. Por exemplo, a peroxinitrila é

conhecida das cadeias laterais de tirosina de nitrato, desse modo inativando algumas enzimas tendo tirosina no sítio ativo (Groves, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2): 226-235). Embora estes produtos sejam tipicamente excretados, as células podem ser geneticamente alteradas para transportar mais produtos do que é típico para uma célula tipo selvagem. Otimizando-se a atividade de um ou mais SRPs da invenção que estão envolvidos na exportação de moléculas específicas, tais como moléculas de sal, pode ser possível melhorar a tolerância ao estresse da célula.

Adicionalmente, as seqüências descritas aqui, ou seus fragmentos, podem ser usadas para gerar mutações silenciadas nos genomas de vários organismos, tais como bactérias, células mamíferas, células de levedura e células de planta (Girke, 1998, The Plant Journal 15: 39-48). As células silenciadas resultantes podem então ser avaliadas quanto a sua capacidade de tolerar várias condições de estresse, sua resposta a várias condições de estresse e o efeito sobre o fenótipo e/ou genótipo da mutação. Para outros métodos de inativação genética, vide Patente U.S. 6.004.804 "Non-Chimeric Mutational Vectors" e Puttaraju et al., 1999, Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy, Nature Biotechnology 17: 246-252.

As estratégias de mutagênese supracitadas para SRPs resultantes do crescimento aumentado sob condições normais ou de estresse e/ou resistência ao estresse aumentado não são destinadas a serem limitantes; variações destas estratégias serão prontamente evidentes para uma pessoa hábil na arte. Usando-se tais estratégias e incorporando-se os mecanismos descritos aqui, as moléculas de ácido nucleico e polipeptídeo da invenção podem ser utilizadas para gerar algas, ciliados, plantas, fungos ou outros microorganismos como *C. glutamicum* expressando moléculas de ácido nucleico de SRP e polipeptídeo mutadas, de modo que o crescimento sob condições normais ou de estresse e/ou a tolerância ao estresse são

melhorados.

A presente invenção também provê anticorpos que especificamente ligam-se a um SRP, ou uma parte dele, quando codificados por um ácido nucleico descrito aqui. Os anticorpos podem ser produzidos por muitos métodos bem conhecidos (vide, p. ex., Harlow e Lane, “Antibodies; A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1988). Resumidamente, o antígeno purificado pode ser injetado dentro de um animal em uma quantidade e em intervalos suficientes para eliciar uma resposta imune. Os anticorpos podem ser purificados diretamente ou células de baço podem ser obtidas do animal. As células podem então ser fundidas com uma linhagem de célula imortal e triadas quanto à secreção de anticorpo. Os anticorpos podem ser usados para triar bibliotecas de clones de ácido nucleico para células secretando o antígeno. Aqueles clones positivos podem então ser seqüenciados (Vide, for exemplo, Kelly et al., 1992, Bio/Technology 10: 163-167; Bebbington et al., 1992, Bio/Technology 10: 169-175).

As frases “liga-se seletivamente” e “liga-se especificamente” com o polipeptídeo refere-se a uma reação de ligação que é determinativa da presença do polipeptídeo em uma população heterogênea de polipeptídeos e outros biológicos. Assim, sob condições de imunoensaio designadas, os anticorpos especificados ligados a um polipeptídeo particular não se ligam em uma quantidade significativa a outros polipeptídeos presentes na amostra. A ligação seletiva de um anticorpo sob tais condições pode requerer um anticorpo que seja selecionado por sua especificidade para um polipeptídeo particular. Uma variedade de formatos de imunoensaio pode ser usada para selecionar anticorpos que seletivamente se ligam com um polipeptídeo particular. Por exemplo, imunoensaios ELISA de fase sólida são rotineiramente usados para selecionar anticorpos seletivamente imunorreativos com um polipeptídeo. Vide Harlow and Lane, “Antibodies, A

Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Publications, Nova Iorque, 1988, para uma descrição dos formatos e condições do imunoensaio que poderiam ser usados para determinar a ligação seletiva.

Em alguns exemplos, é desejável prepararem-se anticorpos de vários hospedeiros. Uma descrição das técnicas para preparar tais anticorpos monoclonais pode ser encontrada em Stites et al., eds., “Basic and Clinical Immunology,” (Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., Fourth Edition) e referências ali citadas, e em Harlow e Lane “Antibodies, A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Publications, Nova Iorque, 1988.

Por todo este pedido, várias publicações são referenciadas. As descrições de todas estas publicações e aquelas referências citadas dentro daquelas publicações em sua totalidade são por este meio incorporadas por referência neste pedido, a fim de mais totalmente descrever o estado da arte a que esta invenção pertence.

Deve também ser entendido que o precedente refere-se a formas de realização preferidas da presente invenção e que numerosas mudanças podem ser feitas nelas sem desvio do escopo da invenção. A invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não são para ser interpretados de forma alguma como impondo limitações em seu escopo. Ao contrário, deve ser claramente entendido que pode-se recorrer a várias outras formas de realização, modificações e seus equivalentes, que, após ler a descrição aqui, possam sugerir-se àqueles hábeis na arte sem desvio do espírito da presente invenção e/ou do escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Crescimento de culturas de *Physcomitrella patens*

Para estudo, plantas da espécie *P. patens* (Hedw.) B.S.G. da coleção da seção de estudos genéticos da University of Hamburg foram usadas. Elas originam-se da cepa 16/14 coletada por H.L.K. Whitehouse em

Gransden Wood, Huntingdonshire (Inglaterra), que foi subcultivada de um esporo por Engel (1968, Am. J. Bot. 55, 438-446). A proliferação das plantas foi realizada por meio de esporos e por meio de regeneração dos gametófitos. O protonema desenvolvido do esporo haplóide como um cloronema rico em

5 cloroplasto e caulonema de baixo cloroplasto, em que os botões formaram-se após aproximadamente 12 dias. Estes cresceram para fornecer gametóforos contendo anterídios e arquegônios. Após fertilização, resultou o esporófito diplóide com uma seta curta e a cápsula de esporos, em que os meiosporos maturaram.

10 O cultivo foi realizado em uma câmara climática em uma temperatura de ar de 25°C e intensidade de luz de 55 micromoles⁻¹m⁻² (luz branca; Philips TL 65W/25 tubo fluorescente) e uma mudança de luz/escuro de 16/8 horas. O musgo foi modificado em cultura líquida usando-semeio Knop de acordo com Reski e Abel (1985, Planta 165:354-358) ou cultivado

15 em meio sólido Knop usando-se 1% de ágar oxóide (Unipath, Basingstoke, Inglaterra). Os protonemas usados para isolamento de RNA e DNA foram cultivados em culturas líquidas aeradas. Os protonemas foram cominuídos cada 9 dias e transferidos para meio de cultura fresco.

Exemplo 2

20 Isolamento Total do DNA das plantas

Os detalhes para o isolamento do DNA total refere-se à elaboração de um peso fresco de grão-de-bico de material de planta. Os materiais usados incluem os seguintes tamponantes: tamponante CTAB: 2% (p/v) brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio brometo (CTAB); 100 mM

25 Tris HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; tampão de N-Laurilsarcosina: 10% (p/v) N-laurilsarcosina; 100 mM Tris HCl pH 8.0; 20 mM EDTA.

O material da planta foi triturado sob nitrogênio líquido em um almofariz para fornecer um pó fino e transferida para vasos Eppendorf de 2 ml. O material de planta congelado foi então coberto com uma camada de 1

ml de tampão de decomposição (tampão CTAB 1 ml, 100 µl de tampão de N-laurilsarcosina, 20 µl of β-mercaptoetanol e 10 µl of solução de proteinase K, 10 mg/ml) e incubado a 60°C por uma hora com contínua agitação. O homogenado obtido foi distribuído em dois recipientes Eppendorf (2 ml) e extraído duas vezes agitando-se com o mesmo volume de clorofórmio/isoamil álcool (24:1). Para separação de fase, a centrifugação foi realizada a 800 x g e temperatura ambiente por 15 minutos em cada caso. O DNA foi então precipitado a -70°C por 30 minutos usando-se isopropanol gelado. O DNA precipitado foi sedimentado a 4°C e 10.000 g por 30 minutos e ressuspenso em 180 µl do tampão TE (Sambrook et al. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Para mais purificação, o DNA foi tratado com NaCl (1,2 M concentração final) e precipitado novamente a -70°C por 30 minutos usando-se duas vezes o volume de etanol absoluto. Após uma etapa de lavagem com 70% de etanol, o DNA foi secado e subsequente absorvido em 50 µl de H₂O + RNase (concentração final 50 mg/ml). O DNA foi dissolvido durante a noite a 4°C e a digestão de RNase foi subsequente realizada a 37°C por 1 hora. Para mais purificação, o DNA foi tratado com NaCl (concentração final de 1,2 M) e precipitado novamente a -70°C por 30 minutos usando-se duas vezes o volume de etanol absoluto. Após a etapa de lavagem com 70% de etano, o DNA foi secado e subsequente absorvido em 50 µl de H₂O + RNase (50 mg/ml concentração final). O DNA foi dissolvido durante a noite a 4°C e a digestão de RNase foi subsequente realizada a 37°C por 1 hora. Armazenagem do DNA ocorreu a 4°C.

Exemplo 3

Isolamento do RNA total e RNA poli-(A)⁺ e construção da biblioteca de cDNA de *Physcomitrella patens*

Para a investigação dos transcritos, tanto RNA total como RNA poli-(A)⁺ foram isolados. O RNA total foi obtido de protonemata com a

idade de 9 dias tipo selvagem, em seguida ao método GTC (Reski et al. 1994, Mol. Gen. Genet., 244: 352-359). The RNA Poly(A)+ foi isolado usando-se Dyna BeadsR (Dynal, Oslo, Norway) seguindo-se as instruções do protocolo do fabricante. Após determinação da concentração do RNA ou do RNA poli(A)+, o RNA foi precipitado por adição de 1/10 volumes de acetato de sódio 3M pH 4,6 e 2 volumes de etanol e armazenado a -70°C .

Para a construção da biblioteca de cDNA, síntese do primeiro filamento foi conseguida usando-se transcriptase reversa do Vírus da Leucemia de Murino (Roche, Mannheim, Alemanha) e iniciadores oligo-d(T), síntese do segundo filamento por incubação com polimerase I de DNA, enzima Klenow e digestão de RNaseH a 12°C (2 horas), 16°C (1 hora), e 22°C (1 hora). A reação foi parada por incubação a 65°C (10 minutos) e subsequente transferida para gelo. Moléculas de DNA de duplo filamento foram embotadas por T4-DNA-polimerase (Roche, Mannheim) a 37°C (30 minutos). Os nucleotídeos foram removidos por extração com fenol/clorofórmio e espino colunas Sephadex G50. Adaptadores EcoRI (Pharmacia, Freiburg, Alemanha) foram ligados às terminações de cDNA por T4-DNA-ligase (Roche, 12°C , durante a noite) e fosforilados por incubação com polinucleotídeo cinase (Roche, 37°C , 30 minutos). Esta mistura foi submetida a separação em um gel de agarose de baixa fusão. As moléculas de DNA maiores do que 300 pares bases foram eluída do gel, extraídas por fenol, concentradas em Eluti-D-colunas (Schleicher e Schuell, Dassel, Alemanha), e foram ligadas aos braços do vetor e acondicionadas em fagos lambda ZAPII ou fagos lambda ZAP-Express, usando-se material e seguindo-se as instruções do fabricante.

Exemplo 4

Anotação de seqüenciamento e função de *Physcomitrella patens* ESTs

As bibliotecas de cDNA como descrito no Exemplo 3 foram

usadas para seqüenciamento de DNA de acordo com métodos padrão e, em particular, pelo método de terminação de cadeia, usando-se o ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemanha). O seqüenciamento aleatório foi realizado

5 subsequente à recuperação preparativa de plasmídeo de bibliotecas de cDNA, via excisão de massa in vivo, retransformação e subsequente revestimento de DH10B em placas de ágar (detalhes de material e protocolo de Stratagene, Amsterdam, Países Baixos). O DNA de plasmídeo foi preparado de cultivo

10 noturno de culturas de *E. coli* em meio Luria-Broth contendo ampicilina (Vide Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) em um robô de preparação de DNA Qiagene (Qiagen, Hilden) de acordo com os protocolos do fabricante. Iniciadores de seqüenciamento com as seguintes seqüências de nucleotídeo foram usados:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' SEQ ID NO:7

5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3' SEQ ID NO:8

5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' SEQ ID NO:9

As seqüências foram processadas e anotadas utilizando-se o

15 pacote de software EST-MAX comercialmente fornecido por Bio-Max (Munich, Alemanha). O programa incorpora praticamente todos os métodos de bioinformática importantes para caracterização funcional e estrutural de seqüências de proteína. Para referência, vide o website em

20 pedant.mips.biochem.mpg.de. Os algoritmos mais importantes incorporados em EST-MAX são: FASTA (pesquisas de base de dados de seqüência muito sensível com estimativas de significância estatística; Pearson, 1990. Comparação de seqüência rápida e sensível com FASTP e FASTA, Methods Enzymol. 183:63-98); BLAST (pesquisas de base de dados de seqüência

25 muito sensível com estimativas de significância estatística; Altschul et al., Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology 215:403-10); PREDATOR (High-accuracy secondary structure prediction from single and

multiple sequences; Frishman and Argos, 1997, 75% accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins* 27:329-335); CLUSTALW (Multiple sequence alignment; Thompson et al., 1994, CLUSTAL W (improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice), *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680); TMAP (Transmembrane region prediction from multiply aligned sequences; Persson and Argos, 1994, Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments, *J. Mol. Biol.* 237:182-192); ALOM2 (Transmembrane region prediction from single sequences; Klein et al., Prediction of protein function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta* 787:221-226 (1984). Version 2 by Dr. K. Nakai); PROSEARCH (Detection of PROSITE protein sequence patterns; Kolakowski et al., 1992, ProSearch: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function. *Biotechniques* 13, 919-921); BLIMPS (Similarity searches against a database of ungapped blocks, Wallace and Henikoff, 1992); PATMAT (a searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases, *CABIOS* 8:249-254. Written by Bill Alford).

Exemplo 5

Identificação de *Physcomitrella patens* ORFs correspondendo a PpAKT-3

cDNAs parciais de *P. patens* (ESTs) foram identificados no programa de seqüenciamento utilizando-se o programa EST-MAX através de análise BLAST. A seqüência de cDNA de nucleotídeo de PpAKT-3 é definida como SEQ ID NO:1. ORF de PpAKT-3 (EST472) codifica o polipeptídeo de 825 Aminoácidos mostrado na SEQ ID NO:2, incluindo o domínio do transportador de potássio da posição De aminoácido 78 à posição De aminoácido 72 da SEQ ID NO:2. A identidade e similaridade da seqüência De

aminoácido de PpAKT-3 com as seqüências de proteína conhecidas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1

Grau de Identidade De aminoácido e Similaridade de PpAKT-

5 3 e Outras Proteínas Homólogas

Acesso Base Dados Pública#	Nome Proteína	Espécie	Identidade Seqüência (%)	Similaridade Seqüência (%)
Q8VXB2	Transportador potássio putativo	Oryza Sativa	51.8	66.9
Q8VXB1	Transportador potássio putativo	Oryza sativa	50.5	67.1
Q653B6	Transportador potássio putativo	Oryza sativa	51.9	67.2
G86436	Proteína transporte potássio provável cevada	Arabidopsis thaliana	51.0	66.5
Q9M7K3	Transportador ion potássio HAK2	Hordeum vulgare	46.7	60.6

Exemplo 6

Clonagem do cDNA de *P. patens* de comprimento total codificando PpAKT-3

10 Para isolar o clone codificando PpAKT-3 (SEQ ID NO:1) de *P. patens*, bibliotecas de cDNA foram criadas com kit de Amplificação de cDNA SMART RACE (Clontech Laboratories) seguindo-se as instruções do fabricante. RNA total isolado como descrito no Exemplo 3 foi usado como o gabarito. As culturas foram tratadas antes do isolamento do RNA como segue:

15 Estresse de Sal: 2, 6, 12, 24, 48 horas com meio suplementado-NaCl 1-M; Estresse Frio: 4°C para os mesmos pontos de tempo que para sal; Estresse de Seca: as culturas foram incubadas em papel filtro seco para os mesmos pontos de tempo que para sal.

Protocolo 5' RACE

20 As seqüências EST identificadas da pesquisa da base de dados como descrito no Exemplo 4 foram usadas para projetar oligos para RACE (vide Tabela 2). As seqüências estendidas para estes genes foram obtidas

realizando-se Amplificação Rápida de reação de cadeia de polimerase das Terminações do cDNA (PCR RACE) , usando-se o Advantage 2 PCR kit (Clontech Laboratories) e o o kit de amplificação de cDNA SMART RACE (Clontech Laboratories) utilizando-se um Biometra T3 Thermocycler, seguindo-se as instruções do fabricante. As seqüências obtidas pelas reações de RACE corresponderam à região de codificação de comprimento total e foram usadas para projetar oligos para clonagem de comprimento total do respectivo gene (vide abaixo amplificação de comprimento total).

Amplificação de Comprimento Total

Clones de comprimento total, correspondendo a PpAKT-3 (SEQ ID NO:1), obtidos realizando-se reação de cadeia de polimerase (PCR) com iniciadores específicos de gene (vide Tabela 2) e o EST original como gabarito. As condições para a reação foram condições padrão com polimerase de DNA PWO (Roche). A PCR foi realizada de acordo com condições padrão e de acordo com protocolos do fabricante (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2a. Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y., Biometra T3 Thermocycler). Os parâmetros para a reação foram: cinco minutos a 94°C, seguido por cinco ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 50°C e 1,5 minutos a 72°C. Isto foi seguido por vinte e cinco ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 65°C e 1,5 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram extraídos de gel de agarose com um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e ligados no vetor TOPO pCR 2.1 (Invitrogen) seguindo-se instruções do fabricante. Vetores recombinantes foram transformados em células Top10 (Invitrogen) empregando-se condições padrão (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2a. Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY). As células transformadas foram selecionadas quanto a ágar LB contendo 100 µg/ml de carbenicilina, 0.8 mg X-gal (5-bromo-4-chloro-3-

indolil- β -D-galactosídeo), e 0,8 mg IPTG (isopropiltio- β -D-galactosídeo) cultivadas durante a noite a 37°C. Colônias brancas foram selecionadas e usadas para inocular 3 ml de LB líquida contendo 100 μ g/ml de ampicilina e cultivadas durante a noite a 37°C. O DNA de plasmídeo foi extraído usando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguindo-se as instruções do fabricante. Análises dos subsequentes clones e mapeamento de restrição foram analisadas de acordo com técnicas de biologia molecular padrão (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2a. Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.).

Tabela 2

Esquema e iniciadores usados para clonagem dos clones de comprimento total

Gene	Sítios Produto Final	Método Isolamento	Iniciadores Race	Iniciadores RT-PCR
PpAKT-3	XmaI/ EcoRV	5' Race PCR e RT-PCR para o clone de comprimento total	(SEQ ID NO:10) CTGAAGCCGGTTTGGA GTGATCGTC RC523: (SEQ ID NO:11) GGAGGGTGGTGACGAT CATGACCATCAC RC738: (SEQ ID NO:12) CCAGCTGTGACGCAGA GGCAGAGAAC RC756: (SEQ ID NO:13) ACCAGCGGCACCCAGC CTCCTTGAG RC757: (SEQ ID NO:14) AGGCAAGGAGGAAGT GCTTCCGCCAA	RC856: (SEQ ID NO:15) ATCCCGGGCGATTGC CTGCTCTGAATGATC AG RC857: (SEQ ID NO:16) GCGTTAACGTCGCCCC TGTACAAAACTCAGA CCCA

Exemplo 7

Identificação de homólogos de PpAKT-3

Colheita de tecido, isolamento de RNA e construção de biblioteca cDNA

Plantas de soja, trigo e canola foram cultivadas sob uma variedade de condições e tratamentos e diferentes tecidos foram colhidos em

vários estágios do desenvolvimento. O crescimento e colheita das plantas foram feitos de uma maneira estratégica, de modo que a probabilidade de colher todos os genes expressáveis em pelo menos uma ou mais das bibliotecas resultantes é maximizada. O mRNA foi isolado como descrito no Exemplo 3 de cada uma das amostras coletadas e as bibliotecas de cDNA foram construídas. Não foi usada nenhuma etapa de amplificação no processo de produção das bibliotecas, a fim de minimizar a redundância de genes dentro da mesma amostra e reter a informação de expressão. Todas as bibliotecas foram 3' geradas de mRNA purificado em colunas dT de oligo. Colônias da transformação da biblioteca de cDNA em *E. coli* foram aleatoriamente colhidas e colocadas dentro de placas de microtitulagem.

Hibridização de Sonda

DNA de plasmídeo foi isolado de colônias de *E. coli* e então localizados nas membranas. Uma bateria de 288 oligonucleotídeos 7-mero radiorrotulados ^{33}P foi seqüencialmente hibridizada nestas membranas. Para aumentar a produção, membranas em duplicata foram processadas. Após 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 via LIMS para um computador. Identidade absoluta foi mantida por codificação de barras para o cassete de imagem, filtro e orientação dentro do cassete. Os filtros foram então tratados usando-se condições relativamente suaves para extrair as sondas ligadas e retornados para as câmaras de hibridização para outra rodada de hibridização. O ciclo de hibridização e formação de imagem foi repetido até o conjunto de 288 oligômeros estar completo.

Após término das hibridizações, um perfil foi gerado para cada mancha (representando uma inserção de cDNA) quanto a quais dos 288 oligonucleotídeos 7-mero radiorrotulados ^{33}P ligaram-se àquela mancha

particular (inserção cDNA) e em que grau. Este perfil é definido como a assinatura gerada por aquele clone. Cada assinatura de clone foi comparada com outras assinaturas geradas pelo mesmo organismo, para identificar agrupamentos de assinaturas relacionadas. Este processo “classifica” todos os clones de um organismo em agrupamentos antes do seqüenciamento.

Isolamento de Gene

Os clones foram separados em vários agrupamentos baseados no fato de terem idênticas ou similares assinaturas de hibridização. Um agrupamento deve ser indicativo da expressão de um gene individual ou família de gene. Um produto secundário desta análise é um perfil de expressão para a abundância de cada gene em uma biblioteca particular. Um seqüenciamento de um trajeto da extremidade 5’ foi usado para predizer a função dos clones particulares por pesquisas de similaridade e motivo em bases de dados de seqüência.

A seqüência de DNA de comprimento total de *P. patens* PpAKT-3 (SEQ ID NO:1) foi reservada junto a bases de dados patenteadas de soja, trigo e canola em um valor E de E-10 (Altschul, Stephen et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Todos os contig hits foram analisados quanto às seqüências de comprimento total putativas e os clones mais longos, representando os contigs de comprimento total putativos foram totalmente seqüenciados.

Uma seqüência da soja e uma seqüência do trigo foram identificadas. Estas são GmAKT-2 e TaAKT-1. A homologia das seqüências de aminoácido de GmAKT-2 and TaAKT-1 com a mais próxima seqüência da arte anterior conhecida é indicada nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3

Grau de Identidade e Similaridade De aminoácido de GmAKT-2 e uma Proteína Similar

Nome do Gene	Seqüência da Base de dados Pública	Nome Proteína	Espécie	Identidade da Seqüência (%)	Similaridade da Seqüência (%)
GmAKT-2	POT4_ARATH	Transportador de Potássio 4	Arabidopsis thaliana	76%	84%

Tabela 4

5 Grau de Identidade e Similaridade Aminoácido de TaAKT-1 e uma Proteína Similar

Nome do Gene	Seqüência da Base de dados Pública	Nome Proteína	Espécie	Identidade Seqüência (%)	Similaridade da Seqüência (%)
TaAKT-1	NP_914903	Transportador de potássio de alta afinidade Putativo	Oryza sativa	80%	84%

Tabela 5

Grau de Identidade De aminoácido das proteínas PpAKT-3, GmAKT-2, and TaAKT-1

	PpAKT-3	GmAKT-2	TaAKT-1
PpAKT-3	100%	45.9%	43.2%
GmAKT-2		100%	40.4%
TaAKT-1			100%

10 O ORF de GmAKT-2 (GM59666231) codifica o polipeptídeo de 821 Aminoácidos mostrado na SEQ ID NO: 4, incluindo o domínio do transportador de potássio da posição De aminoácido 43 à De aminoácido 768. O ORF de TaAKT-1 (TA59824966) codifica o polipeptídeo de 785 Aminoácidos mostrado na SEQ ID NO: 6, incluindo o domínio do transportador de potássio da posição De aminoácido 82 à De aminoácido 732.

15

Exemplo 8

Plantas Arabidopsis tolerantes a estresse de engenharia por superexpressão de um gene AKT

Clonagem dos genes AKT em um vetor binário

20 Os fragmentos contendo os genes AKT P. patens (p. ex.,

PpAKT-3) foram subclonados dos vetores TOPO PCR2.1 recombinantes por dupla digestão com enzimas de restrição de acordo com instruções do fabricante. O subsequente fragmento foi excisado de gel de agarose com um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante e ligados em um vetor binário contendo um gene marcador selecionável. O vetor recombinante resultante continha o correspondente gene AKT na orientação de sentido, sob o super promotor constitutivo.

Transformação de Agrobacterium

Os vetores recombinantes foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 and PMP90, de acordo com as condições padrão (Hoefgen e Willmitzer, 1990).

Transformação de Planta

Plantas *A. thaliana* ecotipo C24 foram cultivadas e transformadas de acordo com condições padrão (Bechtold, 1993, Acad. Sci. Paris. 316: 1194-1199; Bent et al., 1994, Science 265: 1856-1860).

Triagem de Plantas Transformadas

As plantas T1 foram triadas quanto à resistência ao agente de seleção conferido pelo gene marcador selecionável e Sementes T1 foram coletadas. As sementes T1 foram esterilizadas de acordo com protocolos padrão (Xiong et al., 1999, Plant Molecular Biology Reporter 17: 159-170). As sementes foram revestidas em ½ meio Murashige and Skoog (MS) (Sigma-Aldrich) pH 5.7 com KOH, 0.6% ágar e suplementadas com 1% de sacarose, 0,5 g/l ácido 2-[N-Morfolino] etanossulfônico (MES) (Sigma-Aldrich), 50-150 µg/ml de agente de seleção, 500 µg/ml de carbenicilano (Sigma-Aldrich) e 2 µg/ml de enomila (Sigma-Aldrich). As sementes sobre as placas foram vernalizadas por quatro dias a 4°C. As sementes foram germinadas em uma câmara climática em uma temperatura de ar de 22°C e intensidade de luz de 40 micromoles⁻¹m⁻² (luz branca; Philips TL 65W/25 tubo fluorescente) e ciclo de comprimento de dia de 16 horas de luz e 8 horas

de escuro. As mudas transformadas foram selecionadas após 14 dias e transferidas para meio ½ MS pH 5,7 com placas de ágar de 0,6% KOH, suplementadas com 0,6% de ágar, 1% sacarose, 0,5 g/l MES (Sigma-Aldrich), e 2 µg/ml benomila (Sigma-Aldrich) e permitidas recuperarem-se por cinco a sete dias.

Triagem de crescimento sob condições limitadas por água

O gene PpAKT-3 foi superexpresso em *A. thaliana* sob o controle de um promotor constitutivo. Sementes T2 e/ou T3 foram triadas quanto à resistência ao agente de seleção conferido pelo gene marcador selecionável sobre placas e as plantas positivas foram transplantadas para o solo e cultivadas em uma câmara de crescimento por 3 semanas. A umidade do solo foi mantida por todo este tempo a aproximadamente 50% da capacidade máxima de retenção de água do solo.

A água total perdida (transpiração) pela planta durante este tempo foi medida. Após 3 semanas, o inteiro material da planta acima do solo foi coletado, secado a 65°C por 2 dias e pesado. Os resultados são mostrados nas Tabelas 6 e 7. A relação do peso seco (DW) da planta acima do solo para uso de água pela planta é a eficiência de uso da água (WUE). As tabelas 6 e 7 apresentam WUE e DW, respectivamente, para eventos de transformação independente (linhagens). As médias dos quadrados mínimos, erros padrão e valor significativo (p) de uma linhagem, comparados com controles tipo selvagem de uma Análise de Variação, são apresentados. A melhoria percentual das plantas de controle tipo selvagem para WUE (Tabela 6) e DW (Tabela 7) para plantas superexpressando PpAKT-3 (EST 472) são também apresentados.

Tabela 6

Medição	Genótipo	Linhagem	Média Quadrados Mínimos	Erro Padrão	% Melhoria	p
WUE	Tipo Selvagem		1,620	0,064		
	PpAKT-3 (EST 472)	1	2,238	0,225	38	0,0091
		2	2,036	0,201	26	0,0506
		5	2,246	0,225	39	0,0083
		7	2,119	0,201	31	0,0194
		8	2,096	0,201	29	0,0256
		9	2,125	0,201	31	0,018
		10	2,134	0,201	32	0,016

Tabela 7

Medição	Genótipo	Linhagem	Média Quadrados Mínimos	Erro Padrão	% Melhoria	p
DW	Tipo Selvagem		0,110	0,005		
	PpAKT-3 (EST 472)	1	0,129	0,018	17	0,3102
		2	0,146	0,016	32	0,0347
		5	0,149	0,018	35	0,0399
		7	0,123	0,016	12	0,4449
		8	0,160	0,016	45	0,0035
		9	0,147	0,016	33	0,0318
		10	0,164	0,016	48	0,0017

Avaliação da Tolerância à Seca

5 Mudanças T1 foram transferidas para papel filtro seco estéril em uma placa de petri e permitidas dessecar por duas horas a 80% RH (umidade relativa) em uma Percival Growth Cabinet MLR-350H, micromoles-1m² (luz branca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25). A RH foi então diminuída para 60% e as mudas foram mais dessecadas por oito horas. As mudas foram então removidas e colocadas em placas de ½ MS 0,6% de ágar, suplementadas com 10 2 µg/ml de benomila (Sigma-Aldrich) e 0,5 g/l MES (Sigma-Aldrich) e classificadas após cinco dias.

Exemplo 9

Detecção do transgene AKT das linhagens transgênicas de Arabidopsis

15

Ensaio de número de cópias Taqman

O DNA genômico para os ensaios de número de cópias TaqMan foi isolado das amostras de folha em placas de poço profundo de 96-poços, contendo uma bola de aço-cromo, as placas foram colocadas dentro de um freezer a menos 80°C por mais do que 30 minutos e/ou liofilizada durante a noite. Os tecidos congelados contidos nas placas de poços profundos foram moídos. O DNA genômico foi extraído usando-se o Magnesil® Genomic DNA Extraction kit (Promega, Madison, WI) de acordo com instruções do fabricante.

Os iniciadores e sondas PCR foram projetados usando-se software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os iniciadores e sondas foram projetados para tanto um gene de controle endógeno bem como uma região específica para o transgene presente na construção. As sondas foram rotuladas em sua terminação 5' com um fluoroforo repórter para o controle endógeno e outro fluoroforo repórter para os transgenes, e ambos foram rotulados na extremidade 3' com um extintor.

Reações de cadeia de polimerase foram realizadas como descrito por Ingham *et. al.* (BioTechniques 31:132-140, 2001) e Ingham (Methods in Molecular Biology 286: 273-289, 2004).

Exemplo 10

Detecção do mRNA do transgene AKT em linhagens de Arabidopsis transgênicas

Ensaio qRT-PCR

O RNA total para os ensaios qRT-PCR foi isolado de amostras de folhas em poços de uma placa de poços profundos de 96-poços de 1,2 ml (Corning) contendo uma bola de aço-cromo, as placas foram colocadas dentro de um freezer a menos 80°C por mais do que 30 minutos e/ou liofilizadas durante a noite. O tecido congelado dentro das placas de poços profundos foi moído. O RNA total foi extraído usando-se o Magnesil® Genomic DNA Extraction kit (Promega, Madison, WI) de acordo com instruções do

fabricante. O RNA foi então tratado com DNase usando-se o kit livre de DNA (Ambion, Austin, TX) de acordo com instruções do fabricante.

Os iniciadores e sondas PCR foram projetados usando-se software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os iniciadores e sondas foram projetados para tanto um gene de controle endógeno bem como uma região específica para o transgene presente na construção. As sondas foram rotuladas em sua extremidade 5' com um fluoróforo repórter para o controle endógeno e outro fluoróforo repórter para os transgenes, e ambos foram rotulados na extremidade 3' com um extintor.

Reações de cadeia de polimerase foram realizadas em placas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA). O mastermix de uma etapa SYBR Green I qRT-PCR (Eurogentec, San Diego, CA) foi usado de acordo com instruções do fabricante. Diferença de expressão dobradas foi calculada utilizando-se os valores limiares do ciclo exportado, como descrito por Ingham *et. al.* (BioTechniques 31:132-140, 2001) e Ingham (Methods in Molecular Biology 286: 273-289, 2004).

Exemplo 11

Plantas de Colza/Canola tolerantes a Estresse de engenharia superexpressando um gene AKT

Pecíolos cotiledonários de mudas jovens de 4 dias de idade são usadas como explantes para cultura de tecido e transformados de acordo com a patente EP1566443. O cultivar comercial Westar (Agriculture Canada) é a variedade padrão usada para transformação, porém outras variedades podem ser usadas.

Agrobacterium tumefaciens GV3101:pMP90RK contendo um vetor binário é usada para transformação de canola. O vetor binário padrão usado para transformação é pSUN (patente WO02/00900), porém muitos sistemas vetores binários diferentes foram descritos para transformação de planta (p. ex., An, G. in *Agrobacterium Protocols*. Methods in Molecular

Biology vol 44, pp 47-62, Gartland KMA and MR Davey eds. Humana Press, Totowa, Nova Jérsei). Um cassete de expressão genética de planta consiste de pelo menos dois genes – um gene marcador de seleção e um promotor de planta regulando a transcrição do cDNA ou DNA genômico do gene traço.

- 5 Vários genes marcadores de seleção podem ser usados, incluindo o gene *Arabidopsis* codificando uma enzima de ácido acetoidróxi sintase (AHAS) mutada (patentes US 5767366 e 6225105). Similarmente, vários promotores podem ser usados para regular o gene traço para prover tecido constitutivo evolucionista ou regulação ambiental de transcrição genética. Neste exemplo,
- 10 o promotor 34S (números de Acesso ao GenBank M59930 e X16673) é usado para fornecer expressão constitutiva do gene traço.

- Sementes de canola são esterilizadas na superfície em 70% de etanol por 2 minutos, incubadas por 15 min em água de torneira quente a 55°C e então em 1,5% de hipoclorito de sódio por 10 min, seguido por três
- 15 enxágües com água destilada esterilizada. As sementes são então colocadas em meio MS sem hormônios, contendo vitaminas B5 Gamborg, 3% sacarose e 0,8% de oxidagar. As sementes são germinadas a 24°C por 4 dias em baixa luz ($< 50 \mu\text{Mol/m}^2\text{s}$) a 16 h de luz. Os explantes de pecíolo de cotiledôneo com o cotiledôneo ligado são excisados das mudas in vitro e inoculados com
- 20 *Agrobacterium* por imersão da extremidade cortada do explante de pecíolo dentro da suspensão bacteriana. Os explantes são então cultivados por 3 dias em meio MS incl. vitaminas contendo 3,75 mg/l BAP, 3% sacarose, 0,5 g/l MES, pH 5,2, 0,5 mg/l GA3, 0,8% Oxidagar a 24°C, 16 h luz. Após três dias de co-cultivo com *Agrobacterium*, os explantes de pecíolo são transferidos
- 25 para meio de regeneração contendo 3,75 mg/l BAP, 0,5 mg/l GA3, 0,5 g/l MES, pH 5,2, 300 mg/l timentina e agente de seleção até regeneração do rebento. Logo que os explantes começam a desenvolver rebentos, eles são transferidos para meio de alongamento de rebento (A6, contendo meio MS de comprimento total, incluindo vitaminas, 2% sacarose, 0,5% Oxidagar, 100

mg/l mio-inositol, 40 mg/l sulfato de adenina, 0,5 g/l MES, pH 5,8, 0,0025 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 300 mg/l timentina e agente de seleção).

As amostras de material tanto in vitro como de estufa das plantas transgênica primárias (T0) são analisadas por qPCR usando-se sondas TaqMan para confirmar a presença de T-DNA e para determinar o número de integrações de T-DNA.

Semente é produzida das plantas transgênicas primárias por auto-polinação. As plantas de segunda geração são cultivadas em condições de estufa e auto-polinizadas. As plantas são analisadas por qPCR usando-se sondas TaqMan para confirmar a presença de T-DNA e para determinar o número de integrações de T-DNA. Plantas homozigóticas transgênicas, heterozigóticas transgênicas e azigóticas (transgênicas nulas) são comparadas quanto a suas características de crescimento e produção.

Exemplo 12

Plantas de milho tolerantes a estresse de engenharia superexpressando um gene AKT

Células de *Agrobacterium* abrigando os genes e o gene *ahas* do milho no mesmo plasmídeo foram cultivadas em meio YP suplementado com apropriados antibióticos por 1 – 3 dias. Uma alça de células *Agrobacterium* foi coletada e suspensa em 2 ml de meio M-LS-002 (LS-inf) e o tubo contendo as células *Agrobacterium* foi mantido em um agitador por 1 – 3 horas a 1200 rpm.

Sabugos de milho [genótipo J553x(HIIIAxA188)] foram colhidos a 7 – 12 dias após polinação. Os sabugos foram esterilizados em solução de 20% Clorox por 15 min, seguido por enxágüe completo com água estéril. Embriões imaturos com tamanho de 0,8 – 2,0 mm foram dessecados dentro do tubo contendo células *Agrobacterium* em solução LS-inf.

Agro-infecção foi realizada mantendo-se o tubo horizontalmente na coifa laminar em temperatura ambiente por 30 min. A

mistura da agro infecção foi vertida em uma placa contendo o meio de co-cultivo (M-LS-011). Após a agro-solução ter sido pipetada, os embriões foram revestidos no meio de co-cultivo com *schutellum* com o lado para cima e cultivados no escuro a 22°C por 2 – 4 dias.

Os embriões foram transferidos para meio M-MS-101 sem seleção. Sete a dez dias mais tarde, os embriões foram transferidos para meio M-LS-401 contendo 0,75 µM de imazetapir e cultivados por 4 semanas para selecionar as células calosas transformadas.

A regeneração das plantas foi iniciada transferindo-se os calos resistentes a meio M-LS-504 suplementado com 0,75 mM de imazetapir e cultivados sob luz a 2°C por duas a três semanas. Os rebentos regenerados foram então transferidos para a caixa de enraizamento com meio M-MS-607 (0,5 µM imazetapir).

As plantinhas com raízes foram transferidas para mistura de pote e cultivadas em uma câmara de crescimento por uma semana, então transplantadas para potes maiores e mantidas em estufa até maturidade.

Exemplo 13

Avaliação de tolerância a estresse em estufa para plantas transgênicas AKT

Avaliação do Desempenho Seco de Alta Produção

Sementes de milho transgênico separadas para um evento de transformação foram plantadas em pequenos potes. Cada uma destas plantas foi unicamente rotulada, amostrada e analisada quanto ao número de cópias transgênicas. As plantas transgênicas positivas e negativas foram marcadas e pareadas com tamanhos similares para transplante junto com juntas em potes grandes. Isto forneceu um ambiente uniforme e competitivo para as plantas transgênicas positivas e negativas. Os potes grandes foram aguados a uma certa percentagem da capacidade de água de campo do solo, dependendo da severidade do estresse de água desejado. O nível de água do solo foi mantido

por agendamento de dia sim dia não. O crescimento das plantas e os traços de fisiologia tais como altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, murchamento da planta, taxa de extensão da folha, status de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese foram medidos durante o período de crescimento. Após um período de crescimento, a parte acima do solo das plantas foi colhida e o peso fresco e o peso seco de cada planta foi medido. Uma comparação do fenótipo entre as plantas positivas e negativas transgênicas foi então feita.

Ensaio de Eficiência de Uso (WUE) da Água

Mudas de milho transgênicas positivas e negativas para um evento de transformação foram plantadas em um pote com uma dada quantidade de solo e água. Os potes foram cobertos com tampas que permitem que as mudas cresçam completamente porém minimizam a perda de água. Cada pote foi pesado periodicamente e a água adicionada para manter o teor de água inicial. No final do experimento, os pesos fresco e seco de cada planta foram medidos, a água consumida por cada planta foi calculada e a WUE de cada planta foi computada. O crescimento e traços fisiológicos das plantas, tais como WUE, altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, murchamento da planta, taxa de extensão da folha, status de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese foram medidos durante o experimento. Uma comparação do fenótipo entre as plantas transgênicas positivas e negativas foi então feita.

Ensaio de Dessecamento

Sementes de milho transgênico segregantes para um evento de transformação foram plantadas em pequenos potes. Estes potes foram mantidos em uma área dentro da estufa que tinha condições ambientais uniformes e cultivados otimamente. Cada uma destas plantas foi unicamente rotulada, amostrada e analisada quanto ao número de cópias transgênicas. As plantas foram permitidas crescer sob estas condições até alcançarem um

estágio de crescimento predefinido. A água foi então retida. O crescimento da planta e os traços fisiológicos tais como altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, murchamento da planta, taxa de extensão da folha, status de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese foram medidos como aumentos de intensidade de estresse. Uma comparação do fenótipo entre plantas transgênicas positivas e negativas foi então feita.

Ensaio de Ciclagem de Secura

Sementes de milho transgênicas segregantes para um evento de transformação foram plantadas em pequenos potes. Estes potes foram mantidos em uma área da estufa que tinha condições ambientais uniformes e cultivados otimamente. Cada uma destas plantas foi unicamente rotulada, amostrada e analisada quanto ao número de cópias transgênicas. As plantas foram permitidas crescer sob estas condições até alcançarem um estágio de crescimento predefinido. As plantas foram então repetidamente aguadas à saturação em um intervalo de tempo fixo. Este ciclo de água/secura foi repetido durante a duração do experimento. O crescimento e os traços fisiológicos das plantas, tais como altura, diâmetro do caule, enrolamento da folha, taxa de extensão da folha, status de água da folha, teor de clorofila e taxa de fotossíntese foram medidos durante o período de crescimento. No final do experimento, as plantas foram colhidas quanto ao peso fresco e seco acima do solo. Uma comparação do fenótipo entre as plantas transgênicas positivas e negativas foi então feita.

Exemplo 14

Avaliação de tolerância ao estresse no campo para plantas transgênicas AKT

Avaliação da tolerância à secura do milho segregante sob condições livre de chuva

Estresse de secura controlado em um único local ou múltiplos locais é usado. A disponibilidade de água da cultura é controlada por fita de

gotejamento ou irrigação aérea em um local que tenha menos do que 10 cm de altura pluviométrica e temperaturas mínimas maiores do que 5°C esperadas durante uma estação média de 5 meses, ou um local com precipitação da estação esperada interceptada por um “abrigo de impedimento de chuva” automatizado, que retrai para prover condições de campo aberto quando necessário. Práticas agronômicas padrão na área são seguidas por preparação do solo, plantação, fertilização e controle de peste. Cada pedaço de terra é semeada com Semente segregando para a presença de um único evento de inserção transgênica. Um ensaio de número de cópias transgênicas Taqman (como descrito no Exemplo 9) é usado nas amostras de folha para diferenciar os transgênicos das plantas de controle segregantes-nulas. As plantas que foram genotipadas desta maneira são classificadas para uma faixa de fenótipos relacionados com a tolerância à secura, crescimento e produção. 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 a vapor d’água, absorção de CO₂ da folha, teor de clorofila da folha, parâmetros de fluorescência da clorofila relacionados com a fotossíntese, eficiência de uso da água, potencial de água da folha, teor de água relativo da folha, taxa de fluxo de seiva no caule, condutividade hidráulica do caule, temperatura da folha, refletância da folha, absorção de luz pela folha, área da folha, dias para o florescimento, intervalo de antese-sedossidade, duração do enchimento do grão, potencial osmótico, ajustamento 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 disponíveis para fisiologia de campo, usando-se os protocolos padrão providos pelos fabricantes. Plantas individuais são usadas como a unidade de replicação por evento.

Avaliação de tolerância à secura de milho não-segregante sob condições livres de chuva

Estresse de secura controlado em um único local ou múltiplos

locais é usado. A disponibilidade de água de cultura é controlada por fita de gotejamento ou irrigação aérea em um local que tenha menos do que 10 cm pluviométricos e temperaturas mínimas maiores do que 5°C esperadas durante uma estação média de 5 meses, ou um local com esperada precipitação na estação interceptado por um “abrigo de impedimento de chuva” que se retrai para fornecer condições de campo aberto quando não necessário. Práticas agronômicas padrão na área são seguidas para preparação de solo, plantação, fertilização e controle de peste. O leiaute do experimento é projetado para 5 parear um pedaço de terra contendo um evento transgênico não-segregante com um pedaço de terra adjacente de controles de segregação nula. A progênie 10 (ou linhagens derivadas da progênie) de uma planta transgênica que não contém o transgene devido a segregação Mendeliana. Canteiros pareados replicados adicionais para um evento particular são distribuídos em torno do experimento. Uma faixa de fenótipos relacionados com a tolerância à secura, 15 crescimento e produção é classificada nos canteiros pareados e estimada no nível do canteiro. Quando a técnica de medição puderem somente ser aplicadas a plantas individuais, estas são selecionadas aleatoriamente cada vez de dentro do canteiro. Estes fenótipos incluem altura da planta, peso do grão por planta, número de grãos por planta, número de espigas por planta, peso 20 seco acima do solo, condutância da folha ao vapor de água, absorção de CO₂ da folha, teor de clorofila da folha, parâmetros de fluorescência da clorofila relacionados com a fotossíntese, eficiência de uso da água, potencial de água da folha, teor de água relativo da folha, taxa de fluxo da seiva do caule, condutividade hidráulica do caule, temperatura da folha, refletância da folha, 25 absorvência de luz da folha, área da folha, dias para a florescência, intervalo de antese-sedossidade, duração de enchimento do grão, potencial osmótico, ajustamento 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 fisiologia de campo,

usando-se os protocolos padrão providos pelos fabricantes. Canteiros individuais são usados como a unidade de replicação por evento.

Avaliação da tolerância à seca e produção do milho em multi-locais

5 Cinco a vinte locais abrangendo as principais regiões de crescimento de milho são selecionados. Estes são largamente distribuídos para fornecer uma faixa de disponibilidades de água de cultura esperada, baseadas na temperatura média, umidade, precipitação e tipo de solo. A disponibilidade de água de cultura não é modificada além das práticas agronômicas padrão. O

10 leiaute do experimento é projetado para parear com um canteiro contendo um evento transgênico não-segregante com um canteiro adjacente de controles de segregantes nulos. Uma faixa de fenótipos relacionados com a tolerância à seca, crescimento e produção é classificada nos canteiros pareados e estimada no nível de canteiro. Quando a técnica de medição pôde somente ser

15 aplicada a plantas individuais, estas são selecionados aleatoriamente cada vez de dentro do canteiro. Estes fenótipos incluíram altura da planta, peso do grão por planta, número de grãos por planta, número de espigas por planta, peso seco acima do solo, condutância da folha ao vapor de água, absorção de CO₂ pela folha, teor de clorofila da folha, parâmetros de fluorescência de clorofila

20 relacionados com a fotossíntese, eficiência de uso da água, potencial de água da folha, teor de água relativo da folha, taxa de fluxo de seiva no caule, condutividade hidráulica no caule, temperatura da folha, refletância da folha, absorvência de luz pela folha, área da folha, dias para a florescência, intervalo de antese-sedosidade, duração de enchimento do grão, ângulo da folha,

25 enrolamento e sobrevivência da folha. Todas as medições são feitas com instrumentação comercialmente disponíveis para fisiologia de campo, usando-se os protocolos padrão fornecidos pelos fabricantes. Os canteiros individuais são usados como a unidade de replicação por evento.

Apêndice

Sequência de nucleotídeos de PpAKT-3 de *Physcomitrella patens* (EST 472) (SEQ ID NO:1)

ATCCCGGGCGATTGCCTGCTCTGAATGATCAGTGTGGTGAGTGAA
GGAAGTGTGGCTAGTGTGCCCCGCCATTGTGCTCGCCGTCTGAGGAT
CATGTCGACCACTACGGTGTCTGGAGGACGCCGAAGATGGGAGAGG
TGGTCGCAACGGCCAGCAGGCCAACCAAGGGGCGCCTGTGGGACAT
GGATCAGCGGATCGACCAGCCGCTGGGTGCCGAAGCCGACCATGT
TAGGTCCATGTATCGCGACCAGACTATGCCTCCGAGTGTGGTGTTG
TGCCTAGCGTTTCAGAGCCTTGGGGTGGTCTACGGAGACTTGGGCA
CATCACCGTTGTATGTTTTCAAGAGCACGTTTGCTAATGGAGGAGT
GAGGAACGAGGATGACATCATTGGAGCTCTATCCCTCATTATCTAC
ACCCTCACCATTATCCCCTTGATTAAATACGTCTTCATCGTGCTCA
GAGCAAATGACAATGGCGAAGGGGGTTCTTTCGCTCTCTATTCATT
GCTGTGTCGTTACTGTAATATAAGCGCCCTGCCAAATCAACACCCT
TCCGATGCGGAGCTTACCACGTATGTCGTAGACAACGCCCCGCCGC
AAAACCTGGATTCAGAGGAAGCTGGAAAGTAGTGTGCTTGCGCAG
CAAGTGTTGTTGGTTATTGTGCTCTTCGGGACTTGCGATGGTTATCG
GCGACGGCATATTAACCCCGTCTATCTCAGTCTTATCGGCAGTTGT
TGGAATTAAAGCTGCTTCTTCCTCCTTGGATACTAATTTGGTGACA
GGCATTTCGTGCGTCATCTTAGTCATCCTCTTTAGCGTACAGCGCTT
CGGCACAGCGAAAATCTCAGTCTTGTTTCGCACCGATTTTCTTGGTT
TGGTTCCTATCTCTTGCTGTATCGGCTGCTACAACATAATCAAAT
GGGAGAAATCAATCTTCTTAGCCTTCAATCCCCTTCAAATCGTACA
CTTCTTCAGACGGAATGGAAGACAGGGGTGGGAGCATCTCGGAGG
CATCGTGCTGTGTATGACAGGGACTGAAGCGTTGTTTGCCGACTTG
GGCCATTTAGTTGTCGGTCTATTCAGATTGTCTTCACTTCTCTAGT
GTACCCGTGCTTATTTCTGACTTACCTCGGGCAAGCTGCTTACCTC
GTGGAACATATGGAAGACGTTAACGATCCCTTTTATTCCTCACTGC

CGAGTAGTATTTACTGGCCAATCTTCGTGCTGGCAACAATATCAGC
CATGATAGCGAGCCGAGCCATGATCTCCGCCACGTTTTCTATCGTG
AAGCAGGCGACAGCTCTGGGATGCTTTCCTCGAGTGAAGGTTGTG
CACACATCAAATAATGTTGCAGGACAGGTGTATATCCCCGAAATC
AACTGGATTCTTATGGTTCTCTGCCTCTGCGTCACAGCTGGTTTCCG
AGACACGGACCAAATCGGAAATGCTTACGGTATCGCCGTGGTGAT
GGTCATGATCGTCACCACCCTCCTGATGACCCTAGTGATAATCATC
ATTTGGCGGAAGCACTTCCTCCTTGCCTTGCTATTCCTTGTCGTGTT
CGCATCAATCGAGGGAATTTATGTCAGTGCGGTCCTATTCAAGACA
ACTCAAGGAGGCTGGGTGCCGCTGGTTCATTTCCGGTGGTCTTCGGCA
CAGTCATGGGACATGGCATTACGGAACCTTGAAACGCTACCAGT
ATGAGATGCAGCACAAAGGTTTCAGTGGGATGGTTGCTTGGGCTTG
GACCTAGCCTCGGCCTCGTTCGTGTCCCCGGAATCGGTCTCATGTA
CACAGATCTCGCTCATGGAGTGCCGCCGCTATTCTCGCATTTCATC
ACCAATCTCCCCGCCATCCATTCCACCGTAGTCTTCGTCTGCGTTA
AATACCTGCCAGTGAACACGGTACCACAAGATGAGAGATTTCTAA
TCCGTCGCATCGGTTCAAGAGCTTATTCCATGTACCGTTGTGCAGC
ACGTTACGGCTACATAGACCTCCACAAGAAAGATGACAACTTCGA
GCAACTGCTAATTCAAAGCTTAATCAGTTTCGTGCGAGATTGAGTCT
ATGAGAGAGAGCTCAGGCCGGGAGTCCATGGCTGCAAGCTGGACC
CCAGATCAACAGCCGATGGAGGAGGCCACGGTGCCAACCTACGTCG
ACGATCACTCCAAACCGGCTTCAGTTGCAAAGAATGCTGAGATTA
CACAGTCTGATGGGCGGAGGCAACAGCGTCGGCGACGGTTATTCC
ACTCAGTACTCCCAGACCGCCTCGAACTCGGTCGAGATGTCTGCTA
ACCAGGAATGCAGTATTCCAAACCTGAGCGTCAACGGCAGCAACA
GCAGCAGCAGCCCGCATCCGCAAGACGAAGTTGCCTTCCTGAATG
CATGCAAAGATGCTGGCGTGGTGTACATACTCGGTAACAACATCG
TGAAAGCGAGAAAGGATGCAGGATTTTTCAAGAAGCTGGTGATCA
ACTACATGTATACCTTTCTGCGAAGGATAAGCCGAGACAGCAGCG

TGGTGCTCAACATCCCGCACGAGTGCCTACTTCATGTCGGCATGGT
GTACTATGTTTGATTCTTTTGGGTCTGAGTTTTGTACAGGGCGACGT
TAACGC

Seqüência De aminoácido deduzida de PpAKT-3 de
Physcomitrella patens (SEQ ID NO:2)

MSTTTVSEDAEDGRGGRNGQQANQGRLWDMDQRIDQPLGAEADHV
RSMYRDQTMPPSVVLCLAFQSLGVVYGD LGTSPLYVFKSTFANGGVR
NEDDIIGALSLIYTLTIPLIKYVFIVLRANDNGEGGSFALYSLLCRYCN
ISALPNQHPSDAELTTYVVDNARRKTWIRQKLESSVLAQQVLLVIVLF
GTCMVIGDGILTPSISVLSAVVGIIKAASSSLDTNLVTGISCVILVILFSV
QRFGTAKISVLFAPIFLVWFLSLACIGCYNIIKWEKSIFLAFNPLQIVHFF
RRNGRQGW EHLGGIVLCMTGTEALFADLGHFSCRSIQIVFTSLVYPCL
FLTYLGQAAYLVEHMEDVNDPFYSSLPSSIWPIFVLATISAMIASRA
MISATFSIVKQATALGCFPRVKVVHTSNNVAGQVYIPEINWILMVLCL
CVTAGFRD TDQIGNAYGIAVVMVMIVTTLLMTLVIIIWRKHFL LALLF
LVVFASIEGIYVSAVLFKTTQGGWVPLVISVVF GTVMGTWHYGTLKR
YQYEMQHKVSVGWLLGLGPSLGLVRVPGIGL MYTDLAHGVPPFLSH
FITNLP AIHSTVVFVCVKYLPVNTVPQDERFLIRRIGSRAYS MYRCAAR
YGYIDLHKKDDNFEQLLIQSLISFVEIESMRESSGRESMAASWTPDQQP
MEEATVPTTSTITPNRLQLQRMLRLHSLMGGGNSVGDGYSTQYSQTA
SNSVEMSANQECSIPNLSVNGSNSSSSPHPQDEVAFLNACKDAGVVYI
LGNNIVKARKDAGFFKKLVINMYTFLRRISRDSSVVLNIPHECLLHV
GMVYYV*

Seqüência de Nucleotídeo de GmAKT-2 (GM59666231) de
Glycine max (SEQ ID NO:3):

ATTAAAGGAATCATCCAAAGGGA ACTCAAAATGAAATGAAATGGA
AATGTAAGAAGTAGTACTGAAA ACTGAACTCAACTAACTCGTGAC
TCGTCAGAGAGAAGAAAAGAATATCGTTCGTT CGCTCTTACCTTCT
TCACCTTCCTTCCTCTCTCTCTAGAGAATGGAACCGGAATCCGG

AACTTCGACTTCTCGGAATCCTTCTCAGTTGTCTTGGGTGAATCTGT
CTAGGAATTTATTATTAGCGTATCAAAGCTTTGGTGTGGTGTATGG
AGATCTGAGCACTTCTCCTCTCTATGTCTTCACAAGCACCTTCAAG
GGGAAGTTGCAGAATCACCATGACGAGGAACTATATTCGGCACG
TTTTCGTTGATTTTTTTGGACCCTTACTTTGATTCCGTTGCTTAAGTA
TGTATTCATCCTATTGAGTGCTGATGACAACGGGGGAAGGTGGAAC
ATTCGCTCTTTATTCGCTGCTCTGTAGGCATGCCAAGTTTAATTTGC
TCCCCAATCAACAAGCAGCTGATGAGGAGTTATCATCCTATAAAT
ATGGTCCCTCTTCACAGGCTATAGCCTCTTCTCCTCTAAAGAGGTT
TCTGGAGAAACATAAAAGGTTAAGAACAGCCCTGCTTGTTGTGGT
ATTGTTTGGTGCTTGCATGGTCATTGGTGATGGTGTGCTTACTCCA
GCAATTTTCGGTTCTAGCATCAGTCTCAGGACTAAAAGTTACAGAA
AAAAAATTAACAGATGGTGAGCCAAATCTCATTTATTCCTTTTTTT
TTGTTCTCATCATTGCTTTTTGTTATGCTAAGGGCAAATTGGTTGCAG
GTGAACTTGAGAAATTTTCATGTTGTTTGCAGGTGAACTTGTCCTGC
TTGCCTGTGTCATATTGGTTGGACTGTTTGCTCTCCAACATTGTGGC
ACACACAAAGTTGCAGTTATGTTTGCACCAATTGTAATAATCTGGC
TTGTATCAATATTTTCTATTGGGGTGTATAATAACAATTCATTGGAAT
CCAAAAATAGTCCGTGCTATATCGCCATATTATATCATCAAGTTTT
TTAGCAGGACTGGTAAAGAAGGTTGGGTTTCTCTTGGAGGGATACT
TCTTTGTATCACTGGAAGTGAAGCTATGTTTGC GGATCTTGGTCATT
TCACTGCTTCGTCAATAAGGCTTGCAATTTGCGTTTGTTATATACCCG
TGTTTAGTGGTACAGTATATGGGTCAAGCTGCTTTCTTGTCTAAAA
ATCTCGACTCTGTTGATAACGGTTTTTATGACTCAATACCTGACCC
TGTGTTTTTGGCCTGTTTTTCATAATCGCCACCCTTGCTGCAATTGTTG
GGAGTCAAGCTGTTATAACTGCAACTTTCTCCATCATCAAGCAGTG
TCATGCGCTTGGTTGCTTTCCGCGAGTCAAAGTTGTACACACCTCA
AAACATATATATGGACAGATCTATATCCCAGAAATCAATTGGATA
CTTATGATCCTAACTCTTGCAATAACCATTGGATTTTCAGGACACGA

CCATAATTGGAAATGCTTATGGGTTGGCTTGTATGACAGTTATGTT
CATAACTACATTTCTGATGACACTAGTCGCAATCTTTGTCTGGCAG
AAAAGTGTCTTGATTGCTGTTGTATTTCTTTTATTCCTTTGGGTGAT
AGAGGGCGTATATCTATCAGCAGCTTTCATCAAAGTGCCTCAGGG
AGGATGGGTACCTCTAGTCTTATCATTTCATCTTCATGATTGTTATGT
ACGTGTGGCATTATGGAACTCGTAGGAAGTACAGCTATGATCTGC
ACAACAAAGTTTCATTGAAATGGTTACTGGGCTTGGGCCCAAGCCT
TGGCATTGTTTCGTGTACCTGGGATTGGTCTCATCTACACTGAACTG
GCAACAGGCATACCTGCAATATTTTCCCATTTTGTAACAAATCTTC
CTGCATTTACACCAGGTGTTGGTTTTTGTGTTGTGTAATAATCAGTTCCT
GTTCCATATGTTTCACCGGAAGAACGTTTCCTTATTGGGCGAGTTT
GCCCCAGACCATATCGAATGTATAGGTGCATTGTCAGATATGGTTA
CAAGGACATTCAAAGGGATGATGGAGATTTTGAGAATCATCTTAT
ACAGAGTATAGCAGAATTTATCCAAATGGAAGCAGTGCAACCTCA
GTTCTCAAGTTCCGAAGCTTCTTCTTCACTTGATGGGAGGATGGCC
GTTATAAGTTCTAGAACTATGATTATGCTTCAAGTTTAATAGTTT
CTGAGCAGGAGGATATAGGCGTTGACATATCCATCCCTAGCAGCA
GATCTGCAACCCTGCAAAGTTTGCAATCGGTTTACGACGATGAAA
CTCCGCAAGTTAGAAGACGACGAGTAAGATTTTCAGCTACCAGAAA
ACACTGGTATGGATCCCGATGTTAGGGAAGAGCTTTTGGATTTAAT
TCAAGCCAAGGAAGCTGGGGTTGCATATATAATGGGGGCACTCATA
TGTGAAGGCAAGGAAATCATCCTCATTCTTGAAAAAGCTCGTGATT
GATATTGGTTACTCATTCTGCGCAAGAATTGCAGGGGGTCCAGCTG
TAGCTCTTAACATTCCTCACATTAGTCTTATTGAAGTTGGGATGAT
ATATTATGTGTAGTTATTGGTGAAATTTACAACCTTGATCCTAGTTG
CATAGGTAATTAATTGTAGCTCACGGGAAAATGAGTGTCTTTTGGG
GCTACGTGTTTATCTTTGCTTTCGCATCTCTCTCCCAATGTAATTAC
ATAGTTGCAACAATAAGGTTTTAGAAATTATTTAGGAATCAGAAT
ATTTTCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAGAGAGAGACCGAC

ACGCA

Seqüência De aminoácido deduzida de *GmAKT-2* de *Glycine max* (SEQ ID NO:4) :

MEPESGTSTSRNPSQLSWVNLSRNLLLAYQSFGVVYGDLSPLYVFT
STFKGKLQNHDEETIFGTFSLIFWTLTLIPLLKYVFILLSADDNGEGG
TFALYSLLCRHAKFNLLPNQQAADDEELSSYKYGPSSQAIASSPLKRFLE
KHKRLRTALLVVVLFGACMVGDLVTPAISVLASVSGLKVTEKKLT
DGEPNLIYSFFFVLIIAFVMLRANWLQVNLRNFMLFAGELVLLACVIL
VGLFALQHCETHKVAVMFAPIVIIWLVSIFSIGVYNTIHWNPKIVRAIS
PYYIIKFFSRTGKEGWVSLGGILLCITGTEAMFADLGHFTASSIRLAF
VIYPCLVVQYMGQAAFLSKNLDSVDNGFYDSIPDPVFWPVFIATLAA
IVGSQAVITATFSIIKQCHALGCFPRVKVVHTSKHIYGQIYIPEINWILMI
LTLAITIGFQDTTIIGNAYGLACMTVMFITTFMLTLVAIFVWQKSVLIA
VVFLFLWVIEGVYLSAAFIKVPQGGWVPLVLSFIFMIVMYVWHYGT
RRKYSYDLHNKVSLLKWLGLGPSLGIVRVPGLIGLIYTELATGIPAIFSH
FVTNLPAFHQVLVFVCVKSVPPYVSPEERFLIGRVCPRPYRMYRCIV
RYGYKDIQRDDGDFENHLIQSIAEFIQMEAVQPQFSSSEASSSLDGRM
AVISSRNYDYASSLIVSEQEDIGVDISIPSSRSATLQSLQSVYDDETPQV
RRRRVRFQLPENTGMDPDVREELDLIQAKEAGVAYIMGHSYVKAR
KSSSFLKKLVIDIGYSFLRKNCRGPAVALNIPHISLIEVGMIYYV

Seqüência de Nucleotídeo de TaAKT-1 (TA59824966) de *Triticum aestivum* (SEQ ID NO:5):

GTGAGAGAGAGATCATCATCGTACCTTGACGATGGCTGAGCCTCT
GAAGGCAAACGGCAATGGAGCTGCCGAAGGGGGTGCTGCGGGCT
CTGCGTTTGCATCGGTGAAGGTGCCGCCGTCGCCGCCAAGGAGGC
TGCAGAGGTTCGACTCCCTGCATATGGAGGCCGGGAAGATTCTTG
GTGGCCACAGCTATGCAGCCAAGGTTGGCTGGGCGACGACACTGC
ACTTGGCCTTCCAGAGCCTAGGTGTGGTTTATGGGGACATGGGAA
CTTCACCCCTCTATGTGTTCTCCAGCACCTTTACTGGTGGGATCAA

GGACACAGATGACCTCCTTGGTGTTCATGTCCTTGATAATCTATACT
GTACTTCTCCTTCCATTGATGAAATATTGTTTCATTGTCTTGAGAGC
TAATGACAACGGCGATGGCGGAACATTGCACTTTATTCCTTGATA
TCTCGGTATGCTAGGATTAGCTTGATACCAAACCAGCAGGCTGAA
GATGCAACAGTCTCTCACTACAAGTTAGAGTCCCCTACGAATCGTG
TCAAGCGGGCTCATTGGATTAAGGAAAAGATGGAAAACAGCCCGA
AATTTAAGGTCATACTTTTCCTAGTGACAATTCTAGCAACATCAAT
GGTTATTGGTGACGGTGTGCTAACTCCATGTATTTTCAGTGCTTAGT
GCAGTTACGGGAATCAAGCAATCAGCAAAGTCGTAACTCAAGGA
CAAATTGCTGGCATCGCAATCGGCATTCTGATCGCCCTCTTTCTTG
TCCAGCGCTTTGGCACAGACAAAGTTGGTTACACATTTGGCCCAGT
AATCTTTATATGGTTCATCTTAATTGCCGGCATTGGAATTTATAATT
TGATCAAACATGATACTGGAATTCTGAAAGCATTCAACCCACAAT
ACATAGTGGAATATTTCCAAAGAAATGGGAAGGACGGCTGGATTT
CGCTTGGAGGTGTTATCTTATGCATTACAGGAACCGAAGCAATGTT
TGCTGACCTTGGTCACTTCAATGTGAGAGCAATTCAGATTGGCCTT
TCTGCAGTTCTGCTCCCATCAGTATTGCTTGCTTACATGGGACAGG
CTGCATATCTTCGCATCCACCCTGAAGATGTTGCAGATACATTCTA
CAAATCAATCCCAGGTCCATTATATTGGCCAACATTTGTGGTGGCC
GTGGCTGCTGCTATAATTGCAAGCCAAGCTATGATTTCTGGTGCCT
TTGCAATCATTGCTCAGTCCCAAGTTCTTGGTTGCTTTCCACGGGTT
CGTGTCACCTCACACCTCAAAAAAGTATCATGGGCAGGTCTACATCC
CTGAGATCAACTATGCATTAATGATCTTATGTGTAGCTGTGACAGC
TATTTTCCAACTACAGACAAGATTGGCAATGCATATGGTATCGCT
GTCGTCTTTGTGATGTTTATAACAACACTTCTAGTCACACTGGTAA
TGGCCATGATATGGAAGACAAGTCTGCTGTGGATTGCACTCTTTCC
AATAATATTTGGCGGCGCAGAGCTCGTGTACTTATCCTCAGCATTC
TACAAATTTGTAGAAGGTGGCTACTTGCCACTAGGTTTTGCAGCAA
TTTTGATGCTTATAATGGGCACATGGCACTATGTTTCATGTTTCATCG

GTACAAATACGAGCTCAAGAACAAAGTGTCAAACAACCTATGTGGC
AGATTTGGCAACAAGGAGAAATCTTGCTAGGTTGCCAGGAATAGG
CGTTCTGTACTCTGAGCTTGTGCAAGGAATCCCACCCATACTGCCC
CATTTGGTAGAAAAAGTACCTTCCATCCATTCAGTTCTTGTGATTA
CCTCAATAAAGTACTTACCAATCAGCAATATAGAAACAAATGAGC
GGTTCCTCTTCCGATACGTGGAGCCAAGAGAATACAGGGTATTCC
GATGTGTGGTGCGCTATGGTTACAACAATAAAGTAGAAGATCCAA
GAGAGTTCGAGAACTTGCTTATTGGGAACTTGAAGCAATTCATCCA
TCAAGAATCACTCTACAGCGAAAGTAGTCATTCCCTTGAAGGAGA
AGATAATGCATTCGAAGAATCAGGAGATGCAATGGAGCCTTCTAT
TGAAGTTCAAGATGCAAGGTTGCCGAAAAGGTTTTTAGATGGAAT
CACTGCTAGCCCAGTGAACGGGTTAATGGATGAGATAGAGTTTAT
TCAGAGAGGGATGGATGATGGTGTTGTCCATCTGCTGGGAGAAAC
TAATGTGGTGGCGGAGCAAAATGCCGGTTTGGTGAAGAAAATAAT
AGTTGACTACGCCTACAATTTTCATGAGGAAGAAGTTCAGGCAACC
AGAGAAGATCACATGTGTCCCTCATAACAGGCTGCTGCGGGTGGG
AATGACATACGAGATCTAGAGAGATGCTCAGTGGATTGATCAAAT
TGACAATAGCTTCAGTTTTCTCAGTACCAAGTGCAGAAAGGATATG
CAGAGGAACAGCCTCCTTGACTGAACAGCAGAGGATGGAGAGATT
TTATGCGTACAAGTGGTGAAACTACAGTACATGCAATATGTATTTA
CCATATAATATTTTTTTTGTAGGGAAATTCTACTGTATAAGTGTTT
GTTAGCAGTAAGTATGCATAGCTGTCAAACCCCTAGTTTGGCCAAC
TCTTTGCCTTATTGTGGAAACTCAAATCTTAGTATGTGCAGTTG
TACACAAAGATTGTAACCTACCGGCAAAAGTTAAACAAATAATAA
AGTATGACTTGTGTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAGAGAGA
GAGACCGACACGCA

Seqüência De aminoácido deduzida de TaAKT-1 de *Triticum aestivum* (SEQ ID NO:6):

MAEPLKANGNGAAEGGAAGSAFASVKVPPSPPRRLQRFDSLHMEAG

KIPGGHSYAAKVGWATTLHLAFQSLGVVYGDMGTSPLYVFSSTFTGG
IKDTDDL LGVMSLIITYTVLLLPLMKYCFIVLRANDNGDGGTFALYSLIS
RYARISLIPNQQAEDATVSHYKLESPTNRVKRAHWIKEKMENSPKFK
VILFLVTILATSMVIGDGVLTPCISVLSAVTGIIKQSAKSLTQGGQIAGIAI
GILIALFLVQRFGTDKVG YTFGPVIFIWFILIAGIGIYNLIKHDTGILKAF
NPQYIVEYFQRNGKDGWISLGGVILCITGTEAMFADLGHFNVRAIQIG
LSAVLLPSVLLAYMGQAAYLRIHPEDVADTFYKSIPGPLYWPTFVVA
VAAAIISQAMISGAFIIAQSQVLGCFPRVRVTHTSKKYHGQVYIPEI
NYALMILCVAVTAIFQTTDKIGNAYGIAVVFVVMFITTLVTLVMAMI
WKTSLLWIALFPPIIFGGAELVYLSSAFYKFVEGGYLP LGFAAILMLIMG
TWHYVHVHRYKYELKNKVSNNYVADLATRRNLARLP GIGVLYSELV
QGIPPILPHLVEKVPSIHSVLVITSIKYLPISNIETNERFLFRYVEPREYRV
FRCVVRYGYNNKVEDPREFENLLIGNLKQFIHQESLYSESSH SLEGED
NAFEESGDAMEPSIEVQDARLPKRFLDGITASPVNGLMDEIEFIQRGM
DDGVVHLLGETNVVAEQNAGLVKKIIVDYAYNFM RKNFRQPEKITC
VPHNRLLRVGMTYEI

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Polipeptídeos Relacionados a Estresse e métodos de uso em Plantas

<130> PF 0000057861

<140> PCT/EP2007/053219

<141> 2007-04-03

<150> US 60/744,750

<151> 2006-04-13

<160> 16

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 2610

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (93)..(2567)

<223> PpAKT-3

<400> 1

atcccgggcg attgcctgct ctgaatgac agtgtggtga gtgaaggaac tgtggctagt 60

gtgcccgcga ttgtgctcgc cgtctgagga tc atg tcg acc act acg gtg tcg 113

Met Ser Thr Thr Thr Val Ser

1 5

gag gac gcc gaa gat ggg aga ggt ggt cgc aac ggc cag cag gcc aac 161

Glu Asp Ala Glu Asp Gly Arg Gly Gly Arg Asn Gly Gln Gln Ala Asn

10 15 20

caa ggg cgc ctg tgg gac atg gat cag cgg atc gac cag ccg ctg ggt 209

Gln Gly Arg Leu Trp Asp Met Asp Gln Arg Ile Asp Gln Pro Leu Gly

25 30 35

gcc gaa gcc gac cat gtt agg tcc atg tat cgc gac cag act atg cct 257

Ala Glu Ala Asp His Val Arg Ser Met Tyr Arg Asp Gln Thr Met Pro

40 45 50 55

ccg agt gtg gtg ttg tgc cta gcg ttt cag agc ctt ggg gtg gtc tac 305

Pro Ser Val Val Leu Cys Leu Ala Phe Gln Ser Leu Gly Val Val Tyr

60 65 70

gga gac ttg ggc aca tca ccg ttg tat gtt ttc aag agc acg ttt gct 353

Gly Asp Leu Gly Thr Ser Pro Leu Tyr Val Phe Lys Ser Thr Phe Ala

75 80 85

aat gga gga gtg agg aac gag gat gac atc att gga gct cta tcc ctc 401

Asn Gly Gly Val Arg Asn Glu Asp Asp Ile Ile Gly Ala Leu Ser Leu

90 95 100

att atc tac acc ctc acc att atc ccc ttg att aaa tac gtc ttc atc 449

Ile Ile Tyr Thr Leu Thr Ile Ile Pro Leu Ile Lys Tyr Val Phe Ile	
105 110 115	
gtg ctc aga gca aat gac aat ggc gaa ggg ggt tct ttc gct ctc tat	497
Val Leu Arg Ala Asn Asp Asn Gly Glu Gly Gly Ser Phe Ala Leu Tyr	
120 125 130 135	
tca ttg ctg tgt cgt tac tgt aat ata agc gcc ctg cca aat caa cac	545
Ser Leu Leu Cys Arg Tyr Cys Asn Ile Ser Ala Leu Pro Asn Gln His	
140 145 150	
cct tcc gat gcg gag ctt acc acg tat gtc gta gac aac gcc cgc cgc	593
Pro Ser Asp Ala Glu Leu Thr Thr Tyr Val Val Asp Asn Ala Arg Arg	
155 160 165	
aaa acc tgg att cag agg aag ctg gaa agt agt gtg ctt gcg cag caa	641
Lys Thr Trp Ile Gln Arg Lys Leu Glu Ser Ser Val Leu Ala Gln Gln	
170 175 180	
gtg ttg ttg gtt att gtg ctc ttc ggg act tgc atg gtt atc ggc gac	689
Val Leu Leu Val Ile Val Leu Phe Gly Thr Cys Met Val Ile Gly Asp	
185 190 195	
ggc ata tta acc ccg tct atc tca gtc tta tcg gca gtt gtt gga att	737
Gly Ile Leu Thr Pro Ser Ile Ser Val Leu Ser Ala Val Val Gly Ile	
200 205 210 215	
aaa gct gct tct tcc tcc ttg gat act aat ttg gtg aca ggc att tcg	785
Lys Ala Ala Ser Ser Ser Leu Asp Thr Asn Leu Val Thr Gly Ile Ser	
220 225 230	
tgc gtc atc tta gtc atc ctc ttt agc gta cag cgc ttc ggc aca gcg	833
Cys Val Ile Leu Val Ile Leu Phe Ser Val Gln Arg Phe Gly Thr Ala	
235 240 245	
aaa atc tca gtc ttg ttc gca ccg att ttc ttg gtt tgg ttc cta tct	881
Lys Ile Ser Val Leu Phe Ala Pro Ile Phe Leu Val Trp Phe Leu Ser	
250 255 260	
ctt gcc tgt atc ggc tgc tac aac ata atc aaa tgg gag aaa tca atc	929
Leu Ala Cys Ile Gly Cys Tyr Asn Ile Ile Lys Trp Glu Lys Ser Ile	
265 270 275	
ttc tta gcc ttc aat ccc ctt caa atc gta cac ttc ttc aga cgg aat	977
Phe Leu Ala Phe Asn Pro Leu Gln Ile Val His Phe Phe Arg Arg Asn	
280 285 290 295	
gga aga cag ggg tgg gag cat ctc gga ggc atc gtg ctg tgt atg aca	1025
Gly Arg Gln Gly Trp Glu His Leu Gly Gly Ile Val Leu Cys Met Thr	
300 305 310	
ggg act gaa gcg ttg ttt gcc gac ttg ggc cat ttc agt tgt cgg tct	1073
Gly Thr Glu Ala Leu Phe Ala Asp Leu Gly His Phe Ser Cys Arg Ser	
315 320 325	
att cag att gtc ttc act tct cta gtg tac ccg tgc tta ttt ctg act	1121
Ile Gln Ile Val Phe Thr Ser Leu Val Tyr Pro Cys Leu Phe Leu Thr	
330 335 340	
tac ctc ggg caa gct gct tac ctc gtg gaa cat atg gaa gac gtt aac	1169
Tyr Leu Gly Gln Ala Ala Tyr Leu Val Glu His Met Glu Asp Val Asn	
345 350 355	

gat ccc ttt tat tcc tca ctg ccg agt agt att tac tgg cca atc ttc	1217
Asp Pro Phe Tyr Ser Ser Leu Pro Ser Ser Ile Tyr Trp Pro Ile Phe	
360 365 370 375	
gtg ctg gca aca ata tca gcc atg ata gcg agc cga gcc atg atc tcc	1265
Val Leu Ala Thr Ile Ser Ala Met Ile Ala Ser Arg Ala Met Ile Ser	
380 385 390	
gcc acg ttt tct atc gtg aag cag gcg aca gct ctg gga tgc ttt cct	1313
Ala Thr Phe Ser Ile Val Lys Gln Ala Thr Ala Leu Gly Cys Phe Pro	
395 400 405	
cga gtg aag gtt gtg cac aca tca aat aat gtt gca gga cag gtg tat	1361
Arg Val Lys Val Val His Thr Ser Asn Asn Val Ala Gly Gln Val Tyr	
410 415 420	
atc ccc gaa atc aac tgg att ctt atg gtt ctc tgc ctc tgc gtc aca	1409
Ile Pro Glu Ile Asn Trp Ile Leu Met Val Leu Cys Leu Cys Val Thr	
425 430 435	
gct ggt ttc cga gac acg gac caa atc gga aat gct tac ggt atc gcc	1457
Ala Gly Phe Arg Asp Thr Asp Gln Ile Gly Asn Ala Tyr Gly Ile Ala	
440 445 450 455	
gtg gtg atg gtc atg atc gtc acc acc ctc ctg atg acc cta gtg ata	1505
Val Val Met Val Met Ile Val Thr Thr Leu Leu Met Thr Leu Val Ile	
460 465 470	
atc atc att tgg cgg aag cac ttc ctc ctt gcc ttg cta ttc ctt gtc	1553
Ile Ile Ile Trp Arg Lys His Phe Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu Val	
475 480 485	
gtg ttc gca tca atc gag gga att tat gtc agt gcg gtc cta ttc aag	1601
Val Phe Ala Ser Ile Glu Gly Ile Tyr Val Ser Ala Val Leu Phe Lys	
490 495 500	
aca act caa gga ggc tgg gtg ccg ctg gtc att tcg gtg gtc ttc ggc	1649
Thr Thr Gln Gly Gly Trp Val Pro Leu Val Ile Ser Val Val Phe Gly	
505 510 515	
aca gtc atg ggc aca tgg cat tac gga acc ttg aaa cgc tac cag tat	1697
Thr Val Met Gly Thr Trp His Tyr Gly Thr Leu Lys Arg Tyr Gln Tyr	
520 525 530 535	
gag atg cag cac aag gtt tca gtg gga tgg ttg ctt ggg ctt gga cct	1745
Glu Met Gln His Lys Val Ser Val Gly Trp Leu Leu Gly Leu Gly Pro	
540 545 550	
agc ctc ggc ctc gtt cgt gtc ccc gga atc ggt ctc atg tac aca gat	1793
Ser Leu Gly Leu Val Arg Val Pro Gly Ile Gly Leu Met Tyr Thr Asp	
555 560 565	
ctc gct cat gga gtg ccg ccg cta ttc tcg cat ttc atc acc aat ctc	1841
Leu Ala His Gly Val Pro Pro Leu Phe Ser His Phe Ile Thr Asn Leu	
570 575 580	
ccc gcc atc cat tcc acc gta gtc ttc gtc tgc gtt aaa tac ctg cca	1889
Pro Ala Ile His Ser Thr Val Val Phe Val Cys Val Lys Tyr Leu Pro	
585 590 595	
gtg aac acg gta cca caa gat gag aga ttt cta atc cgt cgc atc ggt	1937
Val Asn Thr Val Pro Gln Asp Glu Arg Phe Leu Ile Arg Arg Ile Gly	
600 605 610 615	

tca aga gct tat tcc atg tac cgt tgt gca gca cgt tac ggc tac ata 1985
 Ser Arg Ala Tyr Ser Met Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Tyr Gly Tyr Ile
 620 625 630

gac ctc cac aag aaa gat gac aac ttc gag caa ctg cta att caa agc 2033
 Asp Leu His Lys Lys Asp Asp Asn Phe Glu Gln Leu Leu Ile Gln Ser
 635 640 645

tta atc agt ttc gtc gag att gag tct atg aga gag agc tca ggc cgg 2081
 Leu Ile Ser Phe Val Glu Ile Glu Ser Met Arg Glu Ser Ser Gly Arg
 650 655 660

gag tcc atg gct gca agc tgg acc cca gat caa cag ccg atg gag gag 2129
 Glu Ser Met Ala Ala Ser Trp Thr Pro Asp Gln Gln Pro Met Glu Glu
 665 670 675

gcc acg gtg cca act acg tcg acg atc act cca aac cgg ctt cag ttg 2177
 Ala Thr Val Pro Thr Thr Ser Thr Ile Thr Pro Asn Arg Leu Gln Leu
 680 685 690 695

caa aga atg ctg aga tta cac agt ctg atg ggc gga ggc aac agc gtc 2225
 Gln Arg Met Leu Arg Leu His Ser Leu Met Gly Gly Gly Asn Ser Val
 700 705 710

ggc gac ggt tat tcc act cag tac tcc cag acc gcc tcg aac tcg gtc 2273
 Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Gln Tyr Ser Gln Thr Ala Ser Asn Ser Val
 715 720 725

gag atg tct gct aac cag gaa tgc agt att cca aac ctg agc gtc aac 2321
 Glu Met Ser Ala Asn Gln Glu Cys Ser Ile Pro Asn Leu Ser Val Asn
 730 735 740

ggc agc aac agc agc agc agc ccg cat ccg caa gac gaa gtt gcc ttc 2369
 Gly Ser Asn Ser Ser Ser Ser Pro His Pro Gln Asp Glu Val Ala Phe
 745 750 755

ctg aat gca tgc aaa gat gct ggc gtg gtg tac ata ctc ggt aac aac 2417
 Leu Asn Ala Cys Lys Asp Ala Gly Val Val Tyr Ile Leu Gly Asn Asn
 760 765 770 775

atc gtg aaa gcg aga aag gat gca gga ttt ttc aag aag ctg gtg atc 2465
 Ile Val Lys Ala Arg Lys Asp Ala Gly Phe Phe Lys Lys Leu Val Ile
 780 785 790

aac tac atg tat acc ttt ctg cga agg ata agc cga gac agc agc gtg 2513
 Asn Tyr Met Tyr Thr Phe Leu Arg Arg Ile Ser Arg Asp Ser Ser Val
 795 800 805

gtg ctc aac atc ccg cac gag tgc cta ctt cat gtc ggc atg gtg tac 2561
 Val Leu Asn Ile Pro His Glu Cys Leu Leu His Val Gly Met Val Tyr
 810 815 820

tat gtt tgattctttt gggctctgagt tttgtacagg ggcacgttaa cgc 2610
 Tyr Val
 825

<210> 2

<211> 825

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 2

Met Ser Thr Thr Thr Val Ser Glu Asp Ala Glu Asp Gly Arg Gly Gly
 1 5 10 15

Arg Asn Gly Gln Gln Ala Asn Gln Gly Arg Leu Trp Asp Met Asp Gln
 20 25 30

Arg Ile Asp Gln Pro Leu Gly Ala Glu Ala Asp His Val Arg Ser Met
 35 40 45

Tyr Arg Asp Gln Thr Met Pro Pro Ser Val Val Leu Cys Leu Ala Phe
 50 55 60

Gln Ser Leu Gly Val Val Tyr Gly Asp Leu Gly Thr Ser Pro Leu Tyr
 65 70 75 80

Val Phe Lys Ser Thr Phe Ala Asn Gly Gly Val Arg Asn Glu Asp Asp
 85 90 95

Ile Ile Gly Ala Leu Ser Leu Ile Ile Tyr Thr Leu Thr Ile Ile Pro
 100 105 110

Leu Ile Lys Tyr Val Phe Ile Val Leu Arg Ala Asn Asp Asn Gly Glu
 115 120 125

Gly Gly Ser Phe Ala Leu Tyr Ser Leu Leu Cys Arg Tyr Cys Asn Ile
 130 135 140

Ser Ala Leu Pro Asn Gln His Pro Ser Asp Ala Glu Leu Thr Thr Tyr
 145 150 155 160

Val Val Asp Asn Ala Arg Arg Lys Thr Trp Ile Gln Arg Lys Leu Glu
 165 170 175

Ser Ser Val Leu Ala Gln Gln Val Leu Leu Val Ile Val Leu Phe Gly
 180 185 190

Thr Cys Met Val Ile Gly Asp Gly Ile Leu Thr Pro Ser Ile Ser Val
 195 200 205

Leu Ser Ala Val Val Gly Ile Lys Ala Ala Ser Ser Ser Leu Asp Thr
 210 215 220

Asn Leu Val Thr Gly Ile Ser Cys Val Ile Leu Val Ile Leu Phe Ser
 225 230 235 240

Val Gln Arg Phe Gly Thr Ala Lys Ile Ser Val Leu Phe Ala Pro Ile

245				250				255							
Phe	Leu	Val	Trp	Phe	Leu	Ser	Leu	Ala	Cys	Ile	Gly	Cys	Tyr	Asn	Ile
260			265			270									
Ile	Lys	Trp	Glu	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu	Ala	Phe	Asn	Pro	Leu	Gln	Ile
275			280			285									
Val	His	Phe	Phe	Arg	Arg	Asn	Gly	Arg	Gln	Gly	Trp	Glu	His	Leu	Gly
290			295			300									
Gly	Ile	Val	Leu	Cys	Met	Thr	Gly	Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	Ala	Asp	Leu
305			310			315			320						
Gly	His	Phe	Ser	Cys	Arg	Ser	Ile	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Leu	Val
325			330			335									
Tyr	Pro	Cys	Leu	Phe	Leu	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gln	Ala	Ala	Tyr	Leu	Val
340			345			350									
Glu	His	Met	Glu	Asp	Val	Asn	Asp	Pro	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser
355			360			365									
Ser	Ile	Tyr	Trp	Pro	Ile	Phe	Val	Leu	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Met	Ile
370			375			380									
Ala	Ser	Arg	Ala	Met	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Ala
385			390			395			400						
Thr	Ala	Leu	Gly	Cys	Phe	Pro	Arg	Val	Lys	Val	Val	His	Thr	Ser	Asn
405			410			415									
Asn	Val	Ala	Gly	Gln	Val	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ile	Asn	Trp	Ile	Leu	Met
420			425			430									
Val	Leu	Cys	Leu	Cys	Val	Thr	Ala	Gly	Phe	Arg	Asp	Thr	Asp	Gln	Ile
435			440			445									
Gly	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ile	Ala	Val	Val	Met	Val	Met	Ile	Val	Thr	Thr
450			455			460									
Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Trp	Arg	Lys	His	Phe	Leu
465			470			475			480						
Leu	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Val	Phe	Ala	Ser	Ile	Glu	Gly	Ile	Tyr
485			490			495									

Val Ser Ala Val Leu Phe Lys Thr Thr Gln Gly Gly Trp Val Pro Leu
 500 505 510

Val Ile Ser Val Val Phe Gly Thr Val Met Gly Thr Trp His Tyr Gly
 515 520 525

Thr Leu Lys Arg Tyr Gln Tyr Glu Met Gln His Lys Val Ser Val Gly
 530 535 540

Trp Leu Leu Gly Leu Gly Pro Ser Leu Gly Leu Val Arg Val Pro Gly
 545 550 555 560

Ile Gly Leu Met Tyr Thr Asp Leu Ala His Gly Val Pro Pro Leu Phe
 565 570 575

Ser His Phe Ile Thr Asn Leu Pro Ala Ile His Ser Thr Val Val Phe
 580 585 590

Val Cys Val Lys Tyr Leu Pro Val Asn Thr Val Pro Gln Asp Glu Arg
 595 600 605

Phe Leu Ile Arg Arg Ile Gly Ser Arg Ala Tyr Ser Met Tyr Arg Cys
 610 615 620

Ala Ala Arg Tyr Gly Tyr Ile Asp Leu His Lys Lys Asp Asp Asn Phe
 625 630 635 640

Glu Gln Leu Leu Ile Gln Ser Leu Ile Ser Phe Val Glu Ile Glu Ser
 645 650 655

Met Arg Glu Ser Ser Gly Arg Glu Ser Met Ala Ala Ser Trp Thr Pro
 660 665 670

Asp Gln Gln Pro Met Glu Glu Ala Thr Val Pro Thr Thr Ser Thr Ile
 675 680 685

Thr Pro Asn Arg Leu Gln Leu Gln Arg Met Leu Arg Leu His Ser Leu
 690 695 700

Met Gly Gly Gly Asn Ser Val Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Gln Tyr Ser
 705 710 715 720

Gln Thr Ala Ser Asn Ser Val Glu Met Ser Ala Asn Gln Glu Cys Ser
 725 730 735

Ile Pro Asn Leu Ser Val Asn Gly Ser Asn Ser Ser Ser Ser Pro His
 740 745 750

Pro Gln Asp Glu Val Ala Phe Leu Asn Ala Cys Lys Asp Ala Gly Val
 755 760 765

Val Tyr Ile Leu Gly Asn Asn Ile Val Lys Ala Arg Lys Asp Ala Gly
 770 775 780

Phe Phe Lys Lys Leu Val Ile Asn Tyr Met Tyr Thr Phe Leu Arg Arg
 785 790 795 800

Ile Ser Arg Asp Ser Ser Val Val Leu Asn Ile Pro His Glu Cys Leu
 805 810 815

Leu His Val Gly Met Val Tyr Tyr Val
 820 825

<210> 3
 <211> 2852
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<220>
 <221> CDS
 <222> (166)..(2628)
 <223> GmAKT-2 (GM59666231)

<400> 3
 attaaaggaa tcatccaaag ggaactcaaa atgaaatgaa atggaaatgt aagaagtagt 60
 actgaaaact gaactcaact aactcgtgac tcgtcagaga gaagaaaaga atatacgttcg 120
 ttogctctta ccttcttcac cttccttcct ctctctctct agaga atg gaa ccg gaa 177
 Met Glu Pro Glu
 1

tcc gga act tcg act tct cgg aat cct tct cag ttg tct tgg gtg aat 225
 Ser Gly Thr Ser Thr Ser Arg Asn Pro Ser Gln Leu Ser Trp Val Asn
 5 10 15 20

ctg tct agg aat tta tta tta gcg tat caa agc ttt ggt gtg gtg tat 273
 Leu Ser Arg Asn Leu Leu Leu Ala Tyr Gln Ser Phe Gly Val Val Tyr
 25 30 35

gga gat ctg agc act tct cct ctc tat gtc ttc aca agc acc ttc aag 321
 Gly Asp Leu Ser Thr Ser Pro Leu Tyr Val Phe Thr Ser Thr Phe Lys
 40 45 50

ggg aag ttg cag aat cac cat gac gag gaa act ata ttc ggc acg ttt 369
 Gly Lys Leu Gln Asn His His Asp Glu Glu Thr Ile Phe Gly Thr Phe
 55 60 65

tcg ttg att ttt tgg acc ctt act ttg att ccg ttg ctt aag tat gta 417
 Ser Leu Ile Phe Trp Thr Leu Thr Leu Ile Pro Leu Leu Lys Tyr Val
 70 75 80

ttc atc cta ttg agt gct gat gac aac ggg gaa ggt gga aca ttc gct 465
 Phe Ile Leu Leu Ser Ala Asp Asp Asn Gly Glu Gly Gly Thr Phe Ala

85	90	95	100	
ctt tat tcg ctg ctc tgt agg cat gcc aag ttt aat ttg ctc ccc aat				513
Leu Tyr Ser Leu Leu Cys Arg His Ala Lys Phe Asn Leu Leu Pro Asn				
105	110	115		
caa caa gca gct gat gag gag tta tca tcc tat aaa tat ggt ccc tct				561
Gln Gln Ala Ala Asp Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Lys Tyr Gly Pro Ser				
120	125	130		
tca cag gct ata gcc tct tct cct cta aag agg ttt ctg gag aaa cat				609
Ser Gln Ala Ile Ala Ser Ser Pro Leu Lys Arg Phe Leu Glu Lys His				
135	140	145		
aaa agg tta aga aca gcc ctg ctt gtt gtg gta ttg ttt ggt gct tgc				657
Lys Arg Leu Arg Thr Ala Leu Val Val Val Leu Phe Gly Ala Cys				
150	155	160		
atg gtc att ggt gat ggt gtg ctt act cca gca att tcg gtt cta gca				705
Met Val Ile Gly Asp Gly Val Leu Thr Pro Ala Ile Ser Val Leu Ala				
165	170	175	180	
tca gtc tca gga cta aaa gtt aca gaa aaa aaa tta aca gat ggt gag				753
Ser Val Ser Ser Gly Leu Lys Val Thr Glu Lys Lys Leu Thr Asp Gly Glu				
185	190	195		
cca aat ctc att tat tcc ttt ttt ttt gtt ctc atc att gct ttt gtt				801
Pro Asn Leu Ile Tyr Ser Phe Phe Phe Val Leu Ile Ile Ala Phe Val				
200	205	210		
atg cta agg gca aat tgg ttg cag gtg aac ttg aga aat ttc atg ttg				849
Met Leu Arg Ala Asn Trp Leu Gln Val Asn Leu Arg Asn Phe Met Leu				
215	220	225		
ttt gca ggt gaa ctt gtc ctg ctt gcc tgt gtc ata ttg gtt gga ctg				897
Phe Ala Gly Glu Leu Val Leu Leu Ala Cys Val Ile Leu Val Gly Leu				
230	235	240		
ttt gct ctc caa cat tgt ggc aca cac aaa gtt gca gtt atg ttt gca				945
Phe Ala Leu Gln His Cys Gly Thr His Lys Val Ala Val Met Phe Ala				
245	250	255	260	
cca att gta ata atc tgg ctt gta tca ata ttt tct att ggg gtg tat				993
Pro Ile Val Ile Ile Trp Leu Val Ser Ile Phe Ser Ile Gly Val Tyr				
265	270	275		
aat aca att cat tgg aat cca aaa ata gtc cgt gct ata tcg cca tat				1041
Asn Thr Ile His Trp Asn Pro Lys Ile Val Arg Ala Ile Ser Pro Tyr				
280	285	290		
tat atc atc aag ttt ttt agc agg act ggt aaa gaa ggt tgg gtt tct				1089
Tyr Ile Ile Lys Phe Phe Ser Arg Thr Gly Lys Glu Gly Trp Val Ser				
295	300	305		
ctt gga ggg ata ctt ctt tgt atc act gga act gaa gct atg ttt gcg				1137
Leu Gly Gly Ile Leu Leu Cys Ile Thr Gly Thr Glu Ala Met Phe Ala				
310	315	320		
gat ctt ggt cat ttc act gct tcg tca ata agg ctt gca ttt gcg ttt				1185
Asp Leu Gly His Phe Thr Ala Ser Ser Ile Arg Leu Ala Phe Ala Phe				
325	330	335	340	
ggt ata tac ccg tgt tta gtg gta cag tat atg ggt caa gct gct ttc				1233

Val	Ile	Tyr	Pro	Cys	Leu	Val	Val	Gln	Tyr	Met	Gly	Gln	Ala	Ala	Phe	
345				350				355								
ttg	tct	aaa	aat	ctc	gac	tct	gtt	gat	aac	ggg	ttt	tat	gac	tca	ata	1281
Leu	Ser	Lys	Asn	Leu	Asp	Ser	Val	Asp	Asn	Gly	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ile	
360				365				370								
cct	gac	cct	gtg	ttt	tgg	cct	gtt	ttc	ata	atc	gcc	acc	ctt	gct	gca	1329
Pro	Asp	Pro	Val	Phe	Trp	Pro	Val	Phe	Ile	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	
375				380				385								
att	gtt	ggg	agt	caa	gct	gtt	ata	act	gca	act	ttc	tcc	atc	atc	aag	1377
Ile	Val	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Ile	Thr	Ala	Thr	Phe	Ser	Ile	Ile	Lys	
390				395				400								
cag	tgt	cat	gcg	ctt	ggg	tgc	ttt	ccg	cga	gtc	aaa	gtt	gta	cac	acc	1425
Gln	Cys	His	Ala	Leu	Gly	Cys	Phe	Pro	Arg	Val	Lys	Val	Val	His	Thr	
405				410				415								
tca	aaa	cat	ata	tat	gga	cag	atc	tat	atc	cca	gaa	atc	aat	tgg	ata	1473
Ser	Lys	His	Ile	Tyr	Gly	Gln	Ile	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ile	Asn	Trp	Ile	
425				430				435								
ctt	atg	atc	cta	act	ctt	gca	ata	acc	att	gga	ttt	cag	gac	acg	acc	1521
Leu	Met	Ile	Leu	Thr	Leu	Ala	Ile	Thr	Ile	Gly	Phe	Gln	Asp	Thr	Thr	
440				445				450								
ata	att	gga	aat	gct	tat	ggg	ttg	gct	tgt	atg	aca	gtt	atg	ttc	ata	1569
Ile	Ile	Gly	Asn	Ala	Tyr	Gly	Leu	Ala	Cys	Met	Thr	Val	Met	Phe	Ile	
455				460				465								
act	aca	ttt	ctg	atg	aca	cta	gtc	gca	atc	ttt	gtc	tgg	cag	aaa	agt	1617
Thr	Thr	Phe	Leu	Met	Thr	Leu	Val	Ala	Ile	Phe	Val	Trp	Gln	Lys	Ser	
470				475				480								
gtc	ttg	att	gct	gtt	gta	ttt	ctt	tta	ttc	ctt	tgg	gtg	ata	gag	ggc	1665
Val	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Trp	Val	Ile	Glu	Gly	
485				490				495								
gta	tat	cta	tca	gca	gct	ttc	atc	aaa	gtg	cct	cag	gga	gga	tgg	gta	1713
Val	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ala	Phe	Ile	Lys	Val	Pro	Gln	Gly	Gly	Trp	Val	
505				510				515								
cct	cta	gtc	tta	tca	ttc	atc	ttc	atg	att	gtt	atg	tac	gtg	tgg	cat	1761
Pro	Leu	Val	Leu	Ser	Phe	Ile	Phe	Met	Ile	Val	Met	Tyr	Val	Trp	His	
520				525				530								
tat	gga	act	cgt	agg	aag	tac	agc	tat	gat	ctg	cac	aac	aaa	gtt	tca	1809
Tyr	Gly	Thr	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Leu	His	Asn	Lys	Val	Ser	
535				540				545								
ttg	aaa	tgg	tta	ctg	ggc	ttg	ggc	cca	agc	ctt	ggc	att	gtt	cgt	gta	1857
Leu	Lys	Trp	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Arg	Val	
550				555				560								

gtt ttt gtt tgt gta aaa tca gtt cct gtt cca tat gtt tca ccg gaa	2001
Val Phe Val Cys Val Lys Ser Val Pro Val Pro Tyr Val Ser Pro Glu	
600 605 610	
gaa cgt ttc ctt att ggg cga gtt tgc ccc aga cca tat cga atg tat	2049
Glu Arg Phe Leu Ile Gly Arg Val Cys Pro Arg Pro Tyr Arg Met Tyr	
615 620 625	
agg tgc att gtc aga tat ggt tac aag gac att caa agg gat gat gga	2097
Arg Cys Ile Val Arg Tyr Gly Tyr Lys Asp Ile Gln Arg Asp Asp Gly	
630 635 640	
gat ttt gag aat cat ctt ata cag agt ata gca gaa ttt atc caa atg	2145
Asp Phe Glu Asn His Leu Ile Gln Ser Ile Ala Glu Phe Ile Gln Met	
645 650 655 660	
gaa gca gtg caa cct cag ttc tca agt tcc gaa gct tct tct tca ctt	2193
Glu Ala Val Gln Pro Gln Phe Ser Ser Ser Glu Ala Ser Ser Ser Leu	
665 670 675	
gat ggg agg atg gcc gtt ata agt tct aga aac tat gat tat gct tca	2241
Asp Gly Arg Met Ala Val Ile Ser Ser Arg Asn Tyr Asp Tyr Ala Ser	
680 685 690	
agt tta ata gtt tct gag cag gag gat ata ggc gtt gac ata tcc atc	2289
Ser Leu Ile Val Ser Glu Gln Glu Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Ile	
695 700 705	
cct agc agc aga tct gca acc ctg caa agt ttg caa tcg gtt tac gac	2337
Pro Ser Ser Arg Ser Ala Thr Leu Gln Ser Leu Gln Ser Val Tyr Asp	
710 715 720	
gat gaa act ccg caa gtt aga aga cga cga gta aga ttt cag cta cca	2385
Asp Glu Thr Pro Gln Val Arg Arg Arg Arg Val Arg Phe Gln Leu Pro	
725 730 735 740	
gaa aac act ggt atg gat ccc gat gtt agg gaa gag ctt ttg gat tta	2433
Glu Asn Thr Gly Met Asp Pro Asp Val Arg Glu Glu Leu Leu Asp Leu	
745 750 755	
att caa gcc aag gaa gct ggg gtt gca tat ata atg ggg cac tca tat	2481
Ile Gln Ala Lys Glu Ala Gly Val Ala Tyr Ile Met Gly His Ser Tyr	
760 765 770	
gtg aag gca agg aaa tca tcc tca ttc ttg aaa aag ctc gtg att gat	2529
Val Lys Ala Arg Lys Ser Ser Ser Phe Leu Lys Lys Leu Val Ile Asp	
775 780 785	
att ggt tac tca ttt ctg cgc aag aat tgc agg ggt cca gct gta gct	2577
Ile Gly Tyr Ser Phe Leu Arg Lys Asn Cys Arg Gly Pro Ala Val Ala	
790 795 800	
ctt aac att cct cac att agt ctt att gaa gtt ggg atg ata tat tat	2625
Leu Asn Ile Pro His Ile Ser Leu Ile Glu Val Gly Met Ile Tyr Tyr	
805 810 815 820	
gtg tagttattgg tgaaatttac aacttgatcc tagttgcata ggtaattaat	2678
Val	
tgtagctcac gggaaaatga gtgtcttttg gggctacgtg tttatctttg ctttcgcac	2738
tctctcccaa tgtaattaca tagttgcaac aataagggtt tagaattata tttagggaac	2798

agaatatttt cctcaaaaaa aaaaaaaaaa aagcgagaga gagaccgaca cgca 2852

<210> 4

<211> 821

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 4

Met Glu Pro Glu Ser Gly Thr Ser Thr Ser Arg Asn Pro Ser Gln Leu
1 5 10 15

Ser Trp Val Asn Leu Ser Arg Asn Leu Leu Leu Ala Tyr Gln Ser Phe
20 25 30

Gly Val Val Tyr Gly Asp Leu Ser Thr Ser Pro Leu Tyr Val Phe Thr
35 40 45

Ser Thr Phe Lys Gly Lys Leu Gln Asn His His Asp Glu Glu Thr Ile
50 55 60

Phe Gly Thr Phe Ser Leu Ile Phe Trp Thr Leu Thr Leu Ile Pro Leu
65 70 75 80

Leu Lys Tyr Val Phe Ile Leu Leu Ser Ala Asp Asp Asn Gly Glu Gly
85 90 95

Gly Thr Phe Ala Leu Tyr Ser Leu Leu Cys Arg His Ala Lys Phe Asn
100 105 110

Leu Leu Pro Asn Gln Gln Ala Ala Asp Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Lys
115 120 125

Tyr Gly Pro Ser Ser Gln Ala Ile Ala Ser Ser Pro Leu Lys Arg Phe
130 135 140

Leu Glu Lys His Lys Arg Leu Arg Thr Ala Leu Leu Val Val Val Leu
145 150 155 160

Phe Gly Ala Cys Met Val Ile Gly Asp Gly Val Leu Thr Pro Ala Ile
165 170 175

Ser Val Leu Ala Ser Val Ser Gly Leu Lys Val Thr Glu Lys Lys Leu
180 185 190

Thr Asp Gly Glu Pro Asn Leu Ile Tyr Ser Phe Phe Phe Val Leu Ile
195 200 205

Ile Ala Phe Val Met Leu Arg Ala Asn Trp Leu Gln Val Asn Leu Arg
 210 215 220

Asn Phe Met Leu Phe Ala Gly Glu Leu Val Leu Leu Ala Cys Val Ile
 225 230 235 240

Leu Val Gly Leu Phe Ala Leu Gln His Cys Gly Thr His Lys Val Ala
 245 250 255

Val Met Phe Ala Pro Ile Val Ile Ile Trp Leu Val Ser Ile Phe Ser
 260 265 270

Ile Gly Val Tyr Asn Thr Ile His Trp Asn Pro Lys Ile Val Arg Ala
 275 280 285

Ile Ser Pro Tyr Tyr Ile Ile Lys Phe Phe Ser Arg Thr Gly Lys Glu
 290 295 300

Gly Trp Val Ser Leu Gly Gly Ile Leu Leu Cys Ile Thr Gly Thr Glu
 305 310 315 320

Ala Met Phe Ala Asp Leu Gly His Phe Thr Ala Ser Ser Ile Arg Leu
 325 330 335

Ala Phe Ala Phe Val Ile Tyr Pro Cys Leu Val Val Gln Tyr Met Gly
 340 345 350

Gln Ala Ala Phe Leu Ser Lys Asn Leu Asp Ser Val Asp Asn Gly Phe
 355 360 365

Tyr Asp Ser Ile Pro Asp Pro Val Phe Trp Pro Val Phe Ile Ile Ala
 370 375 380

Thr Leu Ala Ala Ile Val Gly Ser Gln Ala Val Ile Thr Ala Thr Phe
 385 390 395 400

Ser Ile Ile Lys Gln Cys His Ala Leu Gly Cys Phe Pro Arg Val Lys
 405 410 415

Val Val His Thr Ser Lys His Ile Tyr Gly Gln Ile Tyr Ile Pro Glu
 420 425 430

Ile Asn Trp Ile Leu Met Ile Leu Thr Leu Ala Ile Thr Ile Gly Phe
 435 440 445

Gln Asp Thr Thr Ile Ile Gly Asn Ala Tyr Gly Leu Ala Cys Met Thr
 450 455 460

Val Met Phe Ile Thr Thr Phe Leu Met Thr Leu Val Ala Ile Phe Val
 465 470 475 480

Trp Gln Lys Ser Val Leu Ile Ala Val Val Phe Leu Leu Phe Leu Trp
 485 490 495

Val Ile Glu Gly Val Tyr Leu Ser Ala Ala Phe Ile Lys Val Pro Gln
 500 505 510

Gly Gly Trp Val Pro Leu Val Leu Ser Phe Ile Phe Met Ile Val Met
 515 520 525

Tyr Val Trp His Tyr Gly Thr Arg Arg Lys Tyr Ser Tyr Asp Leu His
 530 535 540

Asn Lys Val Ser Leu Lys Trp Leu Leu Gly Leu Gly Pro Ser Leu Gly
 545 550 555 560

Ile Val Arg Val Pro Gly Ile Gly Leu Ile Tyr Thr Glu Leu Ala Thr
 565 570 575

Gly Ile Pro Ala Ile Phe Ser His Phe Val Thr Asn Leu Pro Ala Phe
 580 585 590

His Gln Val Leu Val Phe Val Cys Val Lys Ser Val Pro Val Pro Tyr
 595 600 605

Val Ser Pro Glu Glu Arg Phe Leu Ile Gly Arg Val Cys Pro Arg Pro
 610 615 620

Tyr Arg Met Tyr Arg Cys Ile Val Arg Tyr Gly Tyr Lys Asp Ile Gln
 625 630 635 640

Arg Asp Asp Gly Asp Phe Glu Asn His Leu Ile Gln Ser Ile Ala Glu
 645 650 655

Phe Ile Gln Met Glu Ala Val Gln Pro Gln Phe Ser Ser Ser Glu Ala
 660 665 670

Ser Ser Ser Leu Asp Gly Arg Met Ala Val Ile Ser Ser Arg Asn Tyr
 675 680 685

Asp Tyr Ala Ser Ser Leu Ile Val Ser Glu Gln Glu Asp Ile Gly Val
 690 695 700

Asp Ile Ser Ile Pro Ser Ser Arg Ser Ala Thr Leu Gln Ser Leu Gln
705 710 715 720

Ser Val Tyr Asp Asp Glu Thr Pro Gln Val Arg Arg Arg Arg Val Arg
725 730 735

Phe Gln Leu Pro Glu Asn Thr Gly Met Asp Pro Asp Val Arg Glu Glu
740 745 750

Leu Leu Asp Leu Ile Gln Ala Lys Glu Ala Gly Val Ala Tyr Ile Met
755 760 765

Gly His Ser Tyr Val Lys Ala Arg Lys Ser Ser Ser Phe Leu Lys Lys
770 775 780

Leu Val Ile Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Leu Arg Lys Asn Cys Arg Gly
785 790 795 800

Pro Ala Val Ala Leu Asn Ile Pro His Ile Ser Leu Ile Glu Val Gly
805 810 815

Met Ile Tyr Tyr Val
820

<210> 5
<211> 2794
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

<220>
<221> CDS
<222> (32)..(2386)
<223> TaAKT-1 (TA 59824966)

<400> 5
gtgagagaga gatcatcatc gtaccttgac g atg gct gag cct ctg aag gca 52
Met Ala Glu Pro Leu Lys Ala
1 5

aac ggc aat gga gct gcc gaa ggg ggt gct gcg ggc tct gcg ttt gca 100
Asn Gly Asn Gly Ala Ala Glu Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Phe Ala
10 15 20

tgc gtg aag gtg ccg ccg tgc ccg cca agg agg ctg cag agg ttc gac 148
Ser Val Lys Val Pro Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Gln Arg Phe Asp
25 30 35

tcc ctg cat atg gag gcc ggg aag att cct ggt ggc cac agc tat gca 196
Ser Leu His Met Glu Ala Gly Lys Ile Pro Gly Gly His Ser Tyr Ala
40 45 50 55

gcc aag gtt ggc tgg gcg acg aca ctg cac ttg gcc ttc cag agc cta 244
Ala Lys Val Gly Trp Ala Thr Thr Leu His Leu Ala Phe Gln Ser Leu
60 65 70

ggt gtg gtt tat ggg gac atg gga act tca ccc ctc tat gtg ttc tcc	292
Gly Val Val Tyr Gly Asp Met Gly Thr Ser Pro Leu Tyr Val Phe Ser	
75 80 85	
agc acc ttt act ggt ggg atc aag gac aca gat gac ctc ctt ggt gtc	340
Ser Thr Phe Thr Gly Gly Ile Lys Asp Thr Asp Asp Leu Leu Gly Val	
90 95 100	
atg tcc ttg ata atc tat act gta ctt ctc ctt cca ttg atg aaa tat	388
Met Ser Leu Ile Ile Tyr Thr Val Leu Leu Leu Pro Leu Met Lys Tyr	
105 110 115	
tgt ttc att gtc ttg aga gct aat gac aac ggc gat ggc gga aca ttt	436
Cys Phe Ile Val Leu Arg Ala Asn Asp Asn Gly Asp Gly Gly Thr Phe	
120 125 130 135	
gca ctt tat tcc ttg ata tct cgg tat gct agg att agc ttg ata cca	484
Ala Leu Tyr Ser Leu Ile Ser Arg Tyr Ala Arg Ile Ser Leu Ile Pro	
140 145 150	
aac cag cag gct gaa gat gca aca gtc tct cac tac aag tta gag tcc	532
Asn Gln Gln Ala Glu Asp Ala Thr Val Ser His Tyr Lys Leu Glu Ser	
155 160 165	
cct acg aat cgt gtc aag cgg gct cat tgg att aag gaa aag atg gaa	580
Pro Thr Asn Arg Val Lys Arg Ala His Trp Ile Lys Glu Lys Met Glu	
170 175 180	
aac agc ccg aaa ttt aag gtc ata ctt ttc cta gtg aca att cta gca	628
Asn Ser Pro Lys Phe Lys Val Ile Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Ala	
185 190 195	
aca tca atg gtt att ggt gac ggt gtg cta act cca tgt att tca gtg	676
Thr Ser Met Val Ile Gly Asp Gly Val Leu Thr Pro Cys Ile Ser Val	
200 205 210 215	
ctt agt gca gtt acg gga atc aag caa tca gca aag tcg tta act caa	724
Leu Ser Ala Val Thr Gly Ile Lys Gln Ser Ala Lys Ser Leu Thr Gln	
220 225 230	
gga caa att gct ggc atc gca atc ggc att ctg atc gcc ctc ttt ctt	772
Gly Gln Ile Ala Gly Ile Ala Ile Gly Ile Leu Ile Ala Leu Phe Leu	
235 240 245	
gtc cag cgc ttt ggc aca gac aaa gtt ggt tac aca ttt ggc cca gta	820
Val Gln Arg Phe Gly Thr Asp Lys Val Gly Tyr Thr Phe Gly Pro Val	
250 255 260	
atc ttt ata tgg ttc atc tta att gcc ggc att gga att tat aat ttg	868
Ile Phe Ile Trp Phe Ile Leu Ile Ala Gly Ile Gly Ile Tyr Asn Leu	
265 270 275	
atc aaa cat gat act gga att ctg aaa gca ttc aac cca caa tac ata	916
Ile Lys His Asp Thr Gly Ile Leu Lys Ala Phe Asn Pro Gln Tyr Ile	
280 285 290 295	
gtg gaa tat ttc caa aga aat ggg aag gac ggc tgg att tcg ctt gga	964
Val Glu Tyr Phe Gln Arg Asn Gly Lys Asp Gly Trp Ile Ser Leu Gly	
300 305 310	
ggt gtt atc tta tgc att aca gga acc gaa gca atg ttt gct gac ctt	1012
Gly Val Ile Leu Cys Ile Thr Gly Thr Glu Ala Met Phe Ala Asp Leu	

315	320	325	
ggt cac ttc aat gtg aga gca att cag att ggc ctt tct gca gtt ctg			1060
Gly His Phe Asn Val Arg Ala Ile Gln Ile Gly Leu Ser Ala Val Leu			
330	335	340	
ctc cca tca gta ttg ctt gct tac atg gga cag gct gca tat ctt cgc			1108
Leu Pro Ser Val Leu Leu Ala Tyr Met Gly Gln Ala Ala Tyr Leu Arg			
345	350	355	
atc cac cct gaa gat gtt gca gat aca ttc tac aaa tca atc cca ggt			1156
Ile His Pro Glu Asp Val Ala Asp Thr Phe Tyr Lys Ser Ile Pro Gly			
360	365	370	375
cca tta tat tgg cca aca ttt gtg gtg gcc gtg gct gct gct ata att			1204
Pro Leu Tyr Trp Pro Thr Phe Val Val Ala Val Ala Ala Ala Ile Ile			
380	385	390	
gca agc caa gct atg att tct ggt gcc ttt gca atc att gct cag tcc			1252
Ala Ser Gln Ala Met Ile Ser Gly Ala Phe Ala Ile Ile Ala Gln Ser			
395	400	405	
caa gtt ctt ggt tgc ttt cca cgg gtt cgt gtc act cac acc tca aaa			1300
Gln Val Leu Gly Cys Phe Pro Arg Val Arg Val Thr His Thr Ser Lys			
410	415	420	
aag tat cat ggg cag gtc tac atc cct gag atc aac tat gca tta atg			1348
Lys Tyr His Gly Gln Val Tyr Ile Pro Glu Ile Asn Tyr Ala Leu Met			
425	430	435	
atc tta tgt gta gct gtg aca gct att ttc caa act aca gac aag att			1396
Ile Leu Cys Val Ala Val Thr Ala Ile Phe Gln Thr Thr Asp Lys Ile			
440	445	450	455
ggc aat gca tat ggt atc gct gtc gtc ttt gtg atg ttc ata aca aca			1444
Gly Asn Ala Tyr Gly Ile Ala Val Val Phe Val Met Phe Ile Thr Thr			
460	465	470	
ctt cta gtc aca ctg gta atg gcc atg ata tgg aag aca agt ctg ctg			1492
Leu Leu Val Thr Leu Val Met Ala Met Ile Trp Lys Thr Ser Leu Leu			
475	480	485	
tgg att gca ctc ttt cca ata ata ttt ggc ggc gca gag ctc gtg tac			1540
Trp Ile Ala Leu Phe Pro Ile Ile Phe Gly Gly Ala Glu Leu Val Tyr			
490	495	500	
tta tcc tca gca ttc tac aaa ttt gta gaa ggt ggc tac ttg cca cta			1588
Leu Ser Ser Ala Phe Tyr Lys Phe Val Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Leu			
505	510	515	
ggt ttt gca gca att ttg atg ctt ata atg ggc aca tgg cac tat gtt			1636
Gly Phe Ala Ala Ile Leu Met Leu Ile Met Gly Thr Trp His Tyr Val			
520	525	530	535
cat gtt cat cgg tac aaa tac gag ctc aag aac aaa gtg tca aac aac			1684
His Val His Arg Tyr Lys Tyr Glu Leu Lys Asn Lys Val Ser Asn Asn			
540	545	550	
tat gtg gca gat ttg gca aca agg aga aat ctt gct agg ttg cca gga			1732
Tyr Val Ala Asp Leu Ala Thr Arg Arg Asn Leu Ala Arg Leu Pro Gly			
555	560	565	
ata ggc gtt ctg tac tct gag ctt gtg caa gga atc cca ccc ata ctg			1780

Ile Gly Val Leu Tyr Ser Glu Leu Val Gln Gly Ile Pro Pro Ile Leu	
570 575 580	
ccc cat ttg gta gaa aaa gta cct tcc atc cat tca gtt ctt gtg att	1828
Pro His Leu Val Glu Lys Val Pro Ser Ile His Ser Val Leu Val Ile	
585 590 595	
acc tca ata aag tac tta cca atc agc aat ata gaa aca aat gag cgg	1876
Thr Ser Ile Lys Tyr Leu Pro Ile Ser Asn Ile Glu Thr Asn Glu Arg	
600 605 610 615	
ttc ctc ttc cga tac gtg gag cca aga gaa tac agg gta ttc cga tgt	1924
Phe Leu Phe Arg Tyr Val Glu Pro Arg Glu Tyr Arg Val Phe Arg Cys	
620 625 630	
gtg gtg cgc tat ggt tac aac aat aaa gta gaa gat cca aga gag ttc	1972
Val Val Arg Tyr Gly Tyr Asn Asn Lys Val Glu Asp Pro Arg Glu Phe	
635 640 645	
gag aac ttg ctt att ggg aac ttg aag caa ttc atc cat caa gaa tca	2020
Glu Asn Leu Leu Ile Gly Asn Leu Lys Gln Phe Ile His Gln Glu Ser	
650 655 660	
ctc tac agc gaa agt agt cat tcc ctt gaa gga gaa gat aat gca ttc	2068
Leu Tyr Ser Glu Ser Ser His Ser Leu Glu Gly Glu Asp Asn Ala Phe	
665 670 675	
gaa gaa tca gga gat gca atg gag cct tct att gaa gtt caa gat gca	2116
Glu Glu Ser Gly Asp Ala Met Glu Pro Ser Ile Glu Val Gln Asp Ala	
680 685 690 695	
agg ttg ccg aaa agg ttt tta gat gga atc act gct agc cca gtg aac	2164
Arg Leu Pro Lys Arg Phe Leu Asp Gly Ile Thr Ala Ser Pro Val Asn	
700 705 710	
ggg tta atg gat gag ata gag ttt att cag aga ggg atg gat gat ggt	2212
Gly Leu Met Asp Glu Ile Glu Phe Ile Gln Arg Gly Met Asp Asp Gly	
715 720 725	
gtt gtc cat ctg ctg gga gaa act aat gtg gtg gcg gag caa aat gcc	2260
Val Val His Leu Leu Gly Glu Thr Asn Val Val Ala Glu Gln Asn Ala	
730 735 740	
ggt ttg gtg aag aaa ata ata gtt gac tac gcc tac aat ttc atg agg	2308
Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Val Asp Tyr Ala Tyr Asn Phe Met Arg	
745 750 755	
aag aac ttc agg caa cca gag aag atc aca tgt gtc cct cat aac agg	2356
Lys Asn Phe Arg Gln Pro Glu Lys Ile Thr Cys Val Pro His Asn Arg	
760 765 770 775	
ctg ctg cgg gtg gga atg aca tac gag atc tagagagatg ctcaagtggat	2406
Leu Leu Arg Val Gly Met Thr Tyr Glu Ile	
780 785	
tgatcaaatt gacaatagct tcagttttct cagtaccaag tgcagaaagg atatgcagag	2466
gaacagcctc cttgactgaa cagcagagga tggagagatt ttatgcgtac aagtgggtgaa	2526
actacagtac atgcaatatg tatttaccat ataatatattt ttttgtagg gaaattctac	2586
tgtataagtg tttgttagca gtaagtatgc atagctgtca aaccctagtt ttggccaact	2646

ctttgcctta ttgtggaaaa ctcaaaatct tagtatgtgc agttgtacac aaagattgta 2706
acctaccggc aaaagttaaa caaataataa agtatgactt gtgtgccaaa aaaaaaaaaa 2766
aaaagagaga gagagagacc gacacgca 2794

<210> 6
<211> 785
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 6

Met Ala Glu Pro Leu Lys Ala Asn Gly Asn Gly Ala Ala Glu Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Phe Ala Ser Val Lys Val Pro Pro Ser Pro Pro
20 25 30

Arg Arg Leu Gln Arg Phe Asp Ser Leu His Met Glu Ala Gly Lys Ile
35 40 45

Pro Gly Gly His Ser Tyr Ala Ala Lys Val Gly Trp Ala Thr Thr Leu
50 55 60

His Leu Ala Phe Gln Ser Leu Gly Val Val Tyr Gly Asp Met Gly Thr
65 70 75 80

Ser Pro Leu Tyr Val Phe Ser Ser Thr Phe Thr Gly Gly Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Asp Asp Leu Leu Gly Val Met Ser Leu Ile Ile Tyr Thr Val Leu
100 105 110

Leu Leu Pro Leu Met Lys Tyr Cys Phe Ile Val Leu Arg Ala Asn Asp
115 120 125

Asn Gly Asp Gly Gly Thr Phe Ala Leu Tyr Ser Leu Ile Ser Arg Tyr
130 135 140

Ala Arg Ile Ser Leu Ile Pro Asn Gln Gln Ala Glu Asp Ala Thr Val
145 150 155 160

Ser His Tyr Lys Leu Glu Ser Pro Thr Asn Arg Val Lys Arg Ala His
165 170 175

Trp Ile Lys Glu Lys Met Glu Asn Ser Pro Lys Phe Lys Val Ile Leu
180 185 190

Phe Leu Val Thr Ile Leu Ala Thr Ser Met Val Ile Gly Asp Gly Val

Phe Gln Thr Thr Asp Lys Ile Gly Asn Ala Tyr Gly Ile Ala Val Val
 450 455 460

Phe Val Met Phe Ile Thr Thr Leu Leu Val Thr Leu Val Met Ala Met
 465 470 475 480

Ile Trp Lys Thr Ser Leu Leu Trp Ile Ala Leu Phe Pro Ile Ile Phe
 485 490 495

Gly Gly Ala Glu Leu Val Tyr Leu Ser Ser Ala Phe Tyr Lys Phe Val
 500 505 510

Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Leu Gly Phe Ala Ala Ile Leu Met Leu Ile
 515 520 525

Met Gly Thr Trp His Tyr Val His Val His Arg Tyr Lys Tyr Glu Leu
 530 535 540

Lys Asn Lys Val Ser Asn Asn Tyr Val Ala Asp Leu Ala Thr Arg Arg
 545 550 555 560

Asn Leu Ala Arg Leu Pro Gly Ile Gly Val Leu Tyr Ser Glu Leu Val
 565 570 575

Gln Gly Ile Pro Pro Ile Leu Pro His Leu Val Glu Lys Val Pro Ser
 580 585 590

Ile His Ser Val Leu Val Ile Thr Ser Ile Lys Tyr Leu Pro Ile Ser
 595 600 605

Asn Ile Glu Thr Asn Glu Arg Phe Leu Phe Arg Tyr Val Glu Pro Arg
 610 615 620

Glu Tyr Arg Val Phe Arg Cys Val Val Arg Tyr Gly Tyr Asn Asn Lys
 625 630 635 640

Val Glu Asp Pro Arg Glu Phe Glu Asn Leu Leu Ile Gly Asn Leu Lys
 645 650 655

Gln Phe Ile His Gln Glu Ser Leu Tyr Ser Glu Ser Ser His Ser Leu
 660 665 670

Glu Gly Glu Asp Asn Ala Phe Glu Glu Ser Gly Asp Ala Met Glu Pro
 675 680 685

Ser Ile Glu Val Gln Asp Ala Arg Leu Pro Lys Arg Phe Leu Asp Gly
 690 695 700

Ile Thr Ala Ser Pro Val Asn Gly Leu Met Asp Glu Ile Glu Phe Ile
 705 710 715 720

Gln Arg Gly Met Asp Asp Gly Val Val His Leu Leu Gly Glu Thr Asn
 725 730 735

Val Val Ala Glu Gln Asn Ala Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Val Asp
 740 745 750

Tyr Ala Tyr Asn Phe Met Arg Lys Asn Phe Arg Gln Pro Glu Lys Ile
 755 760 765

Thr Cys Val Pro His Asn Arg Leu Leu Arg Val Gly Met Thr Tyr Glu
 770 775 780

Ile
 785

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 7
 caggaaacag ctatgacc 18

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 8
 ctaaaggga caaaagctg 19

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 9
 tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 10
 <211> 25

<212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 10
 ctgaagccgg tttggagtga tcgtc 25

 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador RC523

 <400> 11
 ggagggtggt gacgatcatg accatcac 28

 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador RC738

 <400> 12
 ccagctgtga cgcagaggca gagaac 26

 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador RC756

 <400> 13
 accagcggca cccagcctcc ttgag 25

 <210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador RC757

 <400> 14
 aggcaaggag gaagtgcctc cgccaa 26

 <210> 15
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador RC856

<400> 15

atccccgggcg attgcctgct ctgaatgac ag

32

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador RC857

<400> 16

gcgttaacgt cgccctgtac aaaactcaga ccca

34

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de:

- um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5;
- um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6;
- um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência para um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5; e
- um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

2. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5.

3. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5.

4. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo tendo pelo menos 80% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5.

5. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo tendo pelo menos 90% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5

6. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

5 7. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

10 8. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 80% de identidade de seqüência com um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

15 9. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 90% de identidade de seqüência com um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

20 10. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de codificar um polipeptídeo que funciona para aumentar o crescimento da planta e/ou a tolerância ao estresse sob condições normais de estresse, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta.

25 11. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender o ácido nucleico como definido na reivindicação 1.

12. Célula de planta transgênica, caracterizada pelo fato de compreender o ácido nucleico como definido na reivindicação 1.

13. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de compreender a célula de planta como definida na reivindicação 12.

14. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de ter crescimento aumentado e/ou tolerância aumentada ao estresse sob condições normais ou de estresse, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta.

5 15. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de a planta ser uma monocotiledônea.

16. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato a planta ser uma dicotiledônea.

10 17. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato a planta ser selecionada do grupo consistindo de milho, trigo, centeio, aveia, triticale, arroz, cevada, soja, amendoim, algodão, colza, canola, mandioca, pimenta, girassol, soja, tagete, plantas solanáceas, batata, tabaco, berinjela, tomate, Vicia species, ervilha, alfafa, café, cacau, chá, Salix species, dedenheiro, coco, grama perene e culturas de forragem.

15 18. Semente de planta produzida pela planta como definida na reivindicação 13, caracterizada pelo fato de a semente compreender o ácido nucleico.

20 19. Semente de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de a semente ser reprodução verdadeira para um crescimento aumentado e/ou aumentada tolerância ao estresse sob condições normais ou de estresse, em comparação com uma variedade tipo selvagem da semente.

25 20. Método para produzir uma planta transgênica contendo um ácido nucleico isolado, em que a planta tem aumentado crescimento e/ou aumentada tolerância ao estresse e/ou aumentada eficiência no uso de água sob condições normais ou de estresse, em comparação com uma variedade tipo selvagem da planta, caracterizado pelo fato de compreender transformar uma célula de planta com um vetor de expressão compreendendo o ácido nucleico e gerar da célula de planta a planta transgênica, em que o ácido nucleico é selecionado do grupo consistindo de:

- um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5;

- um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6;

5 - um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5; e

10 - um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de a planta ser uma monocotiledônea.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato a planta ser uma dicotiledônea.

15 23. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato a planta ser selecionada do grupo consistindo de milho, trigo, centeio, aveia, triticale, arroz, cevada, soja, amendoim, algodão, colza, canola, mandioca, pimenta, girassol, soja, tagete, plantas solanáceas, batata, tabaco, berinjela, tomate, Vicia species, ervilha, alfafa, café, cacau, chá, Salix species,
20 dedenheiro, coco, grama perene e culturas de forragem

24. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o ácido nucleico compreender um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5.

25 25. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o ácido nucleico compreender um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com um polinucleotídeo como definido na SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, ou SEQ ID NO:5.

26. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o ácido nucleico compreender um polinucleotídeo codificando

um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

5 27. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o ácido nucleico compreender um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com um polipeptídeo como definido na SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, ou SEQ ID NO:6.

10 28. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o vetor de expressão compreender um promotor que dirige a expressão do ácido nucleico.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de o promotor ser específico de tecido.

30. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de o promotor ser regulado evolutivamente.

Figura 1

Nome do gene	Identificador do gene	SEQ ID NO: de ácido nucleico	SEQ. ID NO: de proteína
PpAKT-3	EST472	1	2
GmAKT-2	GM59666231	3	4
TaAKT-1	TA59824966	5	6

Figura 2

[illegible]

Figura 2 (cont.)

Domínio do Transportador do Potássio	(símbolo) 
EST 472	do amino ácido 78 a 772
TA59824966	do amino ácido 82 a 732
GM59666231	do amino ácido 43 a 768

RESUMO

“ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA DE PLANTA TRANSGÊNICA, PLANTA TRANSGÊNICA, SEMENTE DE PLANTA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA”

5 Uma planta transgênica transformada por um ácido nucleico codificando Polipeptídeo Relacionado com Estresse (SRP), em que a expressão da sequência de ácido nucleico da planta resulta no crescimento aumentado da planta sob condições normais ou de estresse e/ou tolerância a estresse ambiental, em comparação com uma variedade tipo selvagem da
10 planta. São também fornecidos produtos agrícolas, incluindo sementes, produzidos pelas plantas transgênicas. São também fornecidos SRPs isolados e ácido nucleico isolado codificando os SRPs, e vetores e células hospedeiras contendo os últimos.