

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

(21) **PI 0814098-7 A2**

(22) Data de Depósito: 19/06/2008
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/00
A01H 3/00
A01H 5/00

(54) Título: MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA COM MAIOR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE, COM TEMPO DE FLORESCIMENTO ALTERADO, COM FENÓTIPO FOLIAR ALTERADO, MÉTODO PARA INVESTIGAR UMA PLANTA, PLANTAS, PARTE DE PLANTA OU SEMENTE MUTANTE OU TRANSGÊNICA

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2007 AU 2007903309, 26/03/2008 AU 2008901466

(73) Titular(es): The Australian National University

(72) Inventor(es): Barry James Pogson, Jan Bart Rossel, Philippa Bronwyn Wilson

(74) Procurador(es): Ana Cristina Almeida Müller Wegmann

(86) Pedido Internacional: PCT AU2008000895 de 19/06/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/154695de 24/12/2008

(57) Resumo: MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA COM MAIOR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE, COM TEMPO DE FLORESCIMENTO ALTERADO, COM FENÓTIPO FOLIAR ALTERADO, MÉTODO PARA INVESTIGAR UMA PLANTA, PLANTAS, PARTE DE PLANTA OU SEMENTE MUTANTE OU TRANSGÊNICA. A presente invenção fornece um método para obtenção de plantas com maior resistência ao estresse, em relação à planta nativa, compreendendo: a- Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, resultando em menor atividade associada à SAL1, ou a um homólogo seu, na(s) referida(s) célula(s); b- Regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) células; e c- Seleção de uma ou mais plantas com maior resistência ao estresse, relativamente à planta nativa.

MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA COM MAIOR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE, COM TEMPO DE FLORESCIMENTO ALTERADO, COM FENÓTIPO FOLIAR ALTERADO, MÉTODO PARA INVESTIGAR UMA PLANTA, PLANTAS, PARTE DE PLANTA OU SEMENTE MUTANTE OU TRANSGÊNICA

5

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica a prioridade dos pedidos de patente provisório australianos, de n. 2007903309, depositado em 20 de junho de 2007, e de n. 2008901466, depositado em 10 26 de março de 2008, cujos conteúdos estão integralmente incorporados a este por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à resistência de plantas a 15 estresses, tais como resistência à seca, ao sal, ao calor ou ao frio, resistência à luz e ao pH; refere-se ainda aos métodos e materiais para aumento da resistência de plantas ao estresse, bem como à seleção de plantas para mutações associadas à maior resistência ao estresse. Esta invenção 20 refere-se, também, a métodos e materiais para retardar a floração de plantas e para alterar o formato de suas folhas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O maior fator de limitação no rendimento das lavouras ao 25 redor do mundo é o estresse abiótico, que provoca uma perda média de mais de 50% do rendimento potencial (Boyer, J.S. (1982). "Plant Productivity and Environment" *Science* 218 (4571): 443-448). O estresse abiótico inclui extremos de temperatura, salinidade, solos ácidos, alta intensidade 30 luminosa, seca e combinações desses fatores.

As plantas são sésseis e incapazes de escapar dessas condições estressantes. Elas respondem ao estresse alterando sua composição protéica, seus metabólitos, sua morfologia e

fisiologia. Essas alterações permitem à planta, pela adaptação às condições de estresse, limitar o dano e reparar seus efeitos.

5 Essas alterações são mediadas por processos que percebem o estresse e/ou seus efeitos sobre a planta e ativam rotas sinalizadoras múltiplas e complexas. Rotas diferentes são
10 ativadas, dependendo do tipo de condições estressantes experimentadas pela planta; frequentemente, porém, há uma sobreposição e uma interação entre essas rotas. Essa sobreposição pode levar à tolerância cruzada, que significa tolerância a vários tipos de estresse a despeito de exposição a apenas um deles. Este é um ponto importante, uma vez que
15 raramente os fatores de estresse ocorrem isolados. Por exemplo, o estresse pelo frio provocará, também, o de alta luminosidade, já que o frio faz com que o metabolismo da planta fique mais lento, mas ela continuará capaz de captar tanta energia luminosa quanto antes. Da mesma forma, a seca
20 pode provocar o estresse pelo calor, já que os estômatos irão se fechar para conservar água perdendo, em consequência, o efeito refrescante da transpiração, o que resultará em estresse pelo calor. Além disso, as condições estressantes raramente ocorrem isoladas na natureza. Na Austrália é concebível que uma plantação experimente estresse por seca e
25 por alta luminosidade ao mesmo tempo.

 Embora alguns componentes das rotas sinalizadoras de estresse tenham sido estudados, sua posição nas rotas e as interações entre eles são pouco compreendidas, devido à
30 complexidade das rotas de resposta ao estresse. Da mesma forma, os métodos existentes para aumentar a resistência das plantas ao estresse são limitados.

 Há, portanto, uma necessidade de novos métodos para
35 produção de plantas com maior resistência ao estresse.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

As pesquisas atuais mostraram, surpreendentemente, que mutações no gene SAL1, que resultaram em pouca ou nenhuma atividade associada à proteína SAL1, levaram a uma maior
5 resistência ao estresse nas plantas mutantes.

Sendo assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, apresenta-se um método para obtenção de plantas com resistência ao estresse maior do que a planta nativa, o qual
10 compreende:

- a) Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido
nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células
das plantas, resultando em menor atividade
15 associada ao SAL1, ou a um homólogo seu, na(s)
referida(s) célula(s);
- b) Regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s)
referida(s) célula(s); e
- 20 c) Seleção de uma ou mais plantas com maior
resistência ao estresse do que a planta nativa.

Pelo menos uma mutação ou ácido nucléico exógeno deve ser
25 introduzida, por qualquer método apropriado conhecido. Por
exemplo, mutações podem ser introduzidas por técnicas
mutagênicas químicas ou físicas, ou usando meios de mutação
insercional como transposons ou T-DNA; ácido nucléico exógeno
pode ser introduzido através de meios recombinantes como, por
30 exemplo, permeação celular quimicamente assistida (usando,
p/ex., cálcio, lítio, PEG), eletroporação, microinjeção,
transfecção mediada por lipossoma, bombardeio de
micropartículas (biolística), transformação mediada por
Agrobacterium, infecção viral, fusão protoplasmática ou
35 qualquer outro método apropriado conhecido.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, o método compreende a introdução de, pelo menos, uma mutação no gene SAL1 ou em um homólogo dele, ou a inibição ou supressão da expressão desse gene ou de um homólogo dele.

5

Pelo menos uma mutação deve ser introduzida em uma sequência nucleotídica codificadora do SAL1, ou de um homólogo dele, na(s) referida(s) célula(s) vegetal(is), e deve incluir uma inserção, exclusão ou substituição de um ou mais
10 nucleotídeos.

De acordo com outra modalidade, a mutação deve compreender uma inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos na região dos nucleotídeos 731 a 745, 1226,
15 1518, 1519 e 1690 da SEQ ID No.1, ou uma posição equivalente em um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1.

Conforme outra modalidade, a mutação deve compreender uma
20 mutação de guanina para adenina na posição 1226 da SEQ ID N.1, ou em uma posição equivalente de um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1. A mutação resultante deve levar a uma mudança de aminoácido, de glicina para ácido aspártico, na posição 217 da SEQ ID No.2.

25

Conforme outra modalidade, a mutação deve compreender uma mudança de citosina para timina na posição 731 da SEQ ID No.1, ou em uma posição equivalente de um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1. A mutação resultante
30 deve levar a uma mudança de aminoácido, de alanina para valina, na posição 124 da SEQ ID No.2.

Conforme outra modalidade, a mutação deve compreender uma mudança de guanina para adenina na posição 736 da SEQ ID No.1,

ou em uma posição equivalente de um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1. A mutação resultante deve levar a uma mudança de aminoácido, de ácido glutâmico para lisina, na posição 126 da SEQ ID No.2.

5

Conforme outra modalidade, a mutação deve compreender uma mudança de guanina para adenina na posição 1690 da SEQ ID No.1, ou em uma posição equivalente de um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1.

10

De acordo com outra modalidade, a mutação deve compreender a inserção de um ou mais nucleotídeos entre as posições 734 e 735 da SEQ ID No.1, ou em uma posição equivalente de um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1; ou a mutação deve incluir a substituição dos nucleotídeos 735-745 da SEQ ID No.1, ou de nucleotídeos equivalentes em um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1 com um ou mais nucleotídeos.

20

Conforme outra modalidade, a mutação deve compreender uma inserção de um ou mais nucleotídeos entre, ou incluindo as posições 1518 e 1519 da SEQ ID No.1, ou em uma posição equivalente de um homólogo dos nucleotídeos 191-1991, pelo menos, da SEQ ID No.1.

25

De acordo com uma modalidade, a mutação deve ser uma mutação nula SAL1.

30

De acordo com outra modalidade, ainda, um método da invenção deve incluir a introdução, em uma ou mais das referidas células vegetais, de ácido nucléico exógeno, que iniba a expressão do SAL1 endógeno ou de um homólogo dele, ou que substitua a expressão do SAL1 endógeno, ou de um homólogo dele, pela expressão de uma proteína exógena. Esta deve ser um

mutante exógeno SAL1, ou seu homólogo, ou qualquer outra proteína adequada, tal como uma proteína que forneça um fenótipo selecionável.

5 Plantas resultantes de métodos da invenção devem ter maior resistência a diversos estresses abióticos incluindo, mas não limitado, seca, salinidade, temperatura, luminosidade, pH do solo e toxicidade mineral, ou quaisquer combinação destes, em relação à planta nativa. As plantas
10 devem ter mais resistência que a planta nativa a estresses abióticos induzidos por animais (incluindo animais de pastoreio e organismos infestantes ou parasitas), bactérias, fungos, vírus, ou quaisquer combinações destes.

15 De acordo com uma modalidade, a planta resultante tem, pelo menos, mais resistência à seca do que a planta nativa.

De acordo com outra modalidade de um método da invenção, a planta resultante deve ter o tempo de floração retardado.

20

De acordo com outra modalidade de um método da invenção, a planta resultante deve ter o fenótipo foliar alterado.

De acordo com outra modalidade da invenção, apresenta-se
25 um método para obtenção de uma planta com tempo de floração modificado, relativamente ao da planta nativa, compreendendo:

30 a) Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células vegetais, resultando na redução da atividade associada ao SAL1 ou um homólogo dele, na(s) referida(s) célula(s);

b) Regeneração de uma ou mais plantas da(s) referida(s) célula(s); e

5 c) Seleção de uma ou mais plantas, que tenham seu tempo de floração modificado em relação ao da planta nativa.

De acordo com outra modalidade da invenção, apresenta-se um método para obtenção de uma planta com fenótipo foliar modificado, relativamente ao da planta nativa, compreendendo:

10 a) Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células vegetais, resultando na redução da atividade associada ao SAL1 ou um homólogo dele,
15 na(s) referida(s) célula(s);

b) Regeneração de uma ou mais plantas da(s) referida(s) célula(s); e

20 c) Seleção de uma ou mais plantas, que tenham seu fenótipo foliar modificado em relação ao da planta nativa.

25 Fornecem-se, também, plantas obtidas pelos métodos da invenção, partes de plantas (incluindo folhas, caules, raízes, tubérculos, flores, frutos e partes deles), e sementes mutantes/transgênicas de plantas.

30 De acordo com outra modalidade da invenção, apresenta-se um método para seleção de uma planta quanto à presença de, pelo menos, um alelo mutante de uma sequência nucleotídica codificadora do SAL1, ou de um homólogo dele, compreendendo tal método, a análise do DNA da planta utilizando, pelo menos,

uma molécula de ácido nucléico adequada para uso como sonda ou primer, capaz de hibridizar-se ao gene SAL1, ou homólogo dele, sob condições rigorosas.

5 De acordo com uma modalidade mais específica, o método de seleção pode incluir o uso de, pelo menos, um par de primers oligonucleotídicos adequado à amplificação de uma região do gene SAL1, ou de um homólogo dele, contendo um primer direto e um reverso para detectar a presença, ou ausência, de uma
10 mutação na referida região. Esta pode incluir o gene SAL1 completo, ou homólogo dele, ou apenas uma porção, tal como, por exemplo, (ref. Figura 10), a região do nucleotídeo contendo o exon 3, o intron entre os exons 3 e 4, o exon 5, o intron entre os exons 5 e 6, o exon 6, e o intron entre os
15 exons 6 e 7, ou qualquer combinação deles.

A molécula de ácido nucléico, ou membro de um par de de primers oligonucleotídicos, pode ter qualquer tamanho adequado para hibridização específica a uma sequência nucleotídica alvo
20 sob condições rigorosas, e conter de cerca de 15 a cerca de 100 nucleotídeos, mais especificamente, porém, de cerca de 15 a cerca de 30 nucleotídeos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

25 Figura 1 - Identificação de mutação pontual no gene SAL1 em *alx8*.

30 A. Perfis cromatográficos mostrando a sequência de uma região de uma mutação pontual em cepa selvagem Col-0, e vários indivíduos *alx8* de gerações retrocruzadas, e cepa selvagem Col-0 contendo um constructo APX-2. As linhas inferiores indicam sequência de consenso calculada por Contig Express (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A segunda linha
35 inferior representa a sequência do gene SAL1 obtida de

The Arabidopsis Information Resource (TAIR, www.arabidopsis.org). As caixas tracejadas no esquema indicam o local da mutação pontual, e as caixas sólidas, uma mutação introduzida por primers dCAPS.

5

Todas as sequências, exceto APX2-LUC, estão em orientação inversa, isto é, de 3' para 5'.

B. Alinhamento de todas as sequências dos indivíduos *alx8* e o promotor gene SAL1 + 3kb de TAIR. As setas mostram a orientação da sequência genética de 5' para 3'.

10

Figura 2 - Confirmação da mutação pontual no gene SAL1 em *alx8*

15

O gene SAL1 e, aproximadamente, 1,07 kb do promotor foram digeridos a partir de T8H11 BAC do Arabidopsis Information Resource (TAIR) e ligados no vetor binário pCAZM2300 (CAMBIA, Canberra, Austrália). Ambas as plantas Col-0 de cepa selvagem e *alx8* foram modificadas através de transformação mediada por *Agrobacterium*. Duas linhas de *alx8* complementares às cópias do gene de cepa selvagem foram isoladas. Sete linhas de Col-0 de cepa selvagem contendo o constructo também foram isoladas e não apresentaram fenótipo visível.

20

25

Figura 3 - sequência genômica *alx8* SAL1 (sequência de acesso TAIR: 4010730406; Nome: AT5G63980.1; Tamanho da sequência (bp): 122; última modificação: 17/04/2007). Esta sequência é identificada na lista de sequências como SEQ ID No. Ela é uma versão atualizada do acesso TAIR n. 2160829, o qual localiza os 162 nucleotídeos do códon inicial acima do códon inicial presumido no acesso TAIR n. 2160829.

30

A mutação pontual em *alx8* (g1226a), o códon inicial (atg) e o códon final (tga) estão destacados.

Figura 4 - sequência de aminoácidos de *alx8* (acesso TAIR: Sequência AA: 4010745380; Nome: AT5G63980.1; Tamanho: 407aa; última modificação: 16/08/2007). Esta sequência é identificada na lista de sequências como SEQ ID No2.

A mudança de aminoácido em *alx8* (G217D) está destacada.

Figura 5 - alinhamento de proteínas analogamente a SAL1

Proteínas análogas a SAL1 foram identificadas utilizando a ferramenta blastp do National Centre for Biotechnology Information Website (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov). Elas foram alinhadas utilizando-se CLustalW do European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI; www.ebi.ac.uk). Os números de acesso foram os seguintes: SAL1, AY034894/Q42546 (SEQ ID N.46); *Oryza sativa*, NP_001066326/NM_001072858 (SEQ ID N.44); *Zea mays*, AAK57915/AF288075 (SEQ ID N.45). "*" significa que os resíduos naquela coluna são idênticos em todas as sequências; ":" indica que foram observadas substituições conservadas; e "." indica que foram observadas substituições semi-conservadas.

Figura 6 - Homologia de EST com SAL1 mRNA

A. Utilizando-se blastn do site The Gene Index Program (TGI; www.compbio.dfci.harvard.edu) encontraram-se ESTs homólogos a SAL1 mRNA. Os percentuais de identidade foram calculados pelo mesmo programa.

B. Sequência de alinhamento dos ESTs listados em A. As sequências foram alinhadas usando ClustalW no site

da EMBL-EBI. "*" indica que os nucleotídeos naquela coluna são idênticos em todas as sequências de alinhamento. As sequências a seguir foram identificadas na listagem: abeto (*Spruce*) (SEQ ID No. 47), pinheiro (*Pine*) (SEQ ID No. 48), Medicago (SEQ ID No. 49), Lótus (SEQ ID No. 50), Soja (SEQ ID No. 51), SAL1 (SEQ ID No. 52), oleaginosas (colza) (SEQ ID No. 53), álamo (SEQ ID No. 54), algodão (SEQ ID No. 55), tomate (SEQ ID No. 56), batata (SEQ ID No. 57), cebola (SEQ ID No. 58), trigo (SEQ ID No. 59), cevada (SEQ ID No. 60), arroz (SEQ ID No. 61) e milho (SEQ ID No. 62).

C. Cladograma mostrando uma estimativa de ancestrais comuns baseada no alinhamento apresentado em B. Cálculos realizados no site EMBL-EBI.

Figura 7 - Efeito da seca sobre Col-0 nativa, *fry1-1* e *alx8*

Suspendeu-se a água durante 13 dias, a uma temperatura de 21 °C, 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16h.dia/8h.noite. As plantas são representativas de 5 replicatas biológicas de cada ecotipo. Todas estavam, aproximadamente, no mesmo estágio de desenvolvimento e não estavam floridas no início do período de seca: as plantas nativas tinham 4 semanas; *alx8* e *fry1-1* tinham 8 semanas.

Figura 8 - *fry1-1* e *alx8* são tolerantes à seca

Plantas de 4 semanas foram expostas a condições de seca durante 25 dias, a 21 °C e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12h dia/12h noite.

A. Fotografias de *fry1-1*, C24 nativa, *alx8*, e Col-0 nativa após 0, 10, 17, 21 e 25 dias de exposição à seca. As plantas representam cinco elementos de cada genótipo em dois experimentos separados.

5 B. A perda de água através do solo foi aproximada pelo tamanho do vaso durante o tempo do experimento. São dados os tamanhos dos vasos das plantas em A) e os tamanhos médios dos vasos. As barras de erro são desvios-padrão de cinco replicatas biológicas.

10

Figura 9 - sequência genômica de *SAL1* a partir do mutante SALK_020882 de *A. thaliana* tolerante à seca (os códons inicial (atg) e final (tga) estão em destaque). Linha de inserção de T-DNA no ecotipo Col-0 obtida do Arabidopsis Biological
15 Resource Centre (ABRC). A mutação é alélica a *alx8*.

A. O sítio de inserção dado por TAIR. Este foi estabelecido por seqüenciamento em um único passo a partir do LB da inserção de T-DNA, o qual forneceu
20 sequência complementar, isto é, no sentido do terminal 5' do gene (SEQ ID No.3).

B. Para confirmar o local de inserção, procedeu-se a um protocolo de cauda PCR a partir do terminal esquerdo
25 do inserto sobre o DNA de uma planta. A sequência foi obtida de ambos os lados, indicando a possibilidade de uma dupla inserção. A sequência indicou, também, a exclusão de 11bp ao redor do sítio de inserção (SEQ ID No.4).

30

Figura 10 - descrição em escala do gene *SAL1*. Os exons estão representados por caixas e os íntrons por linhas. As setas representam os primers designados para amplificação (ver Tabela 1). Os locais de inserção de *Salk* e *fry1-3*, de

fry1-1, *fry1-2*, e *hos2* bem como as mutações pontuais identificadas em *alx8* também estão mostradas.

Figura 11 - Western blot de SAL1. A abundância da proteína SAL1 em extratos de proteínas totais solúveis de folhas de Col-0, C24, *alx8* e *fry1-1*, *in vivo*, foi comparada com 5 ng de proteína SAL1 recombinante usando anticorpos anti-SAL1 (Fig. 11A) e proteína total de folhas de Col-0 e *alx8* (Fig. 11B). A maior subunidade de rubisco detectada por corante Ponceau foi utilizada como controle de carregamento. Foram analisadas duas plantas de cada genótipo. São indicadas as massas moleculares dos marcadores protéicos.

Figura 12 - Fotografias, da esquerda para a direita, de mutante *alx8*, mutante *fry1-1*, Col-0 nativa, C24 nativa e mutante *Salk_020882* de *Arabidopsis thaliana*, mostrando a morfologia similar das folhas alteradas dos mutantes de *Salk_020882* e *alx8*, e a morfologia alterada das folhas do mutante *fry1-1* comparada com a correspondente C24 nativa.

Figura 13 - Diagrama de barras mostrando o número médio de dias que as plantas sobreviveram sem água. A mutante *Salk_020882* apresentou a maior tolerância à seca, sobrevivendo, em média, por 18,4 dias, em comparação com 16,3 dias para o mutante *alx8* e 12,0 dias para a planta nativa (tamanho das amostras: três plantas nativas e *alx8*, e seis *Salk_020882*).

Figura 14 - Fotografias mostrando: linha inferior - teste de seca; linha superior - controles. Da esquerda para a direita: plantas nativas (11 dias, pouco antes da morte das plantas devido ao estresse pela seca), mutantes *Salk_020882* e *alx8* (ambas mostrando-se, ainda, viáveis após 14 dias de seca).

Figuras 15A e 15B - A Figura 15A apresenta fotografias de, da esquerda para a direita, Col-0 nativa, *alx8*, *Salk_020882*, *fry1-1* e C24 nativa após (de cima para baixo) 0, 14, 16 e 18 dias de exposição às condições de seca e, em seguida, três dias após reidratação. As plantas mutantes *alx8* e *fry1-1* apresentaram, três dias após reidratadas, forte recuperação incluindo folhas verdes e firmes, enquanto as plantas nativas mostraram pouco ou nenhum sinal de recuperação, com a maioria de suas folhas apresentando-se cloróticas e murchas. As plantas mostradas representam experimentos em triplicatas envolvendo cinco plantas de cada genótipo. A Figura 15B mostra o conteúdo de água no solo (SWC) durante o período de seca.

Figuras 16A e 16B - A Figura 16A apresenta o conteúdo relativo de águas nas folhas (RWC) e a Figura 16B, o potencial hídrico das folhas de Col-0 e *alx8* em condições sem estresse e após 12 dias de seca. As colunas representam a média $\pm$ desvio-padrão (DP) de, pelo menos, quatro plantas.

20

Figura 17 - Mostra fotografias de Col-0 nativa (superior) e *alx8* (inferior) com 2, 3, 5 e 8 semanas; observa-se atraso no desenvolvimento das plantas *alx8*. É evidente, também, que a planta Col-0 nativa com 8 semanas está em floração (os brotos estão evidentes), enquanto *alx8* não.

25

Figura 18 - A. apresenta um gráfico de barras da espessura das folhas de Col-0 nativa e de *alx8*;

B. mostra seções transversais de folhas típicas de Col-0 nativa e *alx8*.

30

Figura 19 - fotografias apresentando os resultados de coramento por iodo, de folhas de *fry1-1*, C24 nativa, *alx8* e Col-0 nativa pela manhã (topo) e à noite (parte inferior),

35

mostrando que as mutantes SAL1 têm níveis de amido significativamente menores em seus cloroplastos.

Figura 20 - análise dos componentes principais (PCA) dos perfis de metabólitos dos mutantes SAL1 e seus correspondentes nativos. As abundâncias de mais de 150 metabólitos em, pelo menos, quatro replicatas biológicas de cada ecotipo foram utilizadas para calcular o PCA. Os percentuais de variância total experimentados pelos componentes principais, 1 e 2 (PC1 e PC2) estão grafados.

Figura 21 - mostra o impacto do tamanho, desenvolvimento e morfologia sobre a tolerância à seca. (A) tolerância à seca de Col-0, *alx8* e *salk_020882* no mesmo estágio de desenvolvimento (início da floração). Imagens representativas de 27 plantas *alx8* e 5 *fry1-1* nos dias 0 e 9 do período de seca são apresentadas. As plantas cresceram sob dias de 12 horas. (B) tolerância à seca de plantas no mesmo estágio vegetativo de desenvolvimento (mature green): *alx8* e *fry1-1*, 4 semanas, e Col-0 8 semanas. As plantas representam cinco replicatas biológicas de cada ecotipo, sob condições de crescimento de dias de 16 horas. (C) os tamanhos de vasos para (A) foram medidos e registrados como percentuais do peso original. Estão registrados média + DP de cinco de cada linha. (D) área de Rosette de um grupo de plantas Col-0 com 30 dias de desenvolvimento crescidas em dois experimentos distintos estão grafadas contra a viabilidade em condições de seca. Condições de crescimento foram dias de 8h. (E) desidratação de rosettes isoladas. Os dados representam a média + DP de quatro replicatas biológicas. Os experimentos foram repetidos três vezes. (F) Plantas Col-0 (1 por vaso) e *alx8* (2 por vaso), de mesma idade, foram privadas de água durante 9 dias. As condições de crescimento foram dias de 16 horas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA - ácido abscísico

IP₃ -1,4,5-trifosfato de inositol

I(1,4)P₂ - 1,4-bifosfato de inositol

5 I(4,5)P₂ -4,5-bifosfato de inositol

PAP - 5'-fosfato de 3'-poliadenosina

ROS - espécies reativas de oxigênio

WT - nativa

10 **DEFINIÇÕES**

O termo "compreendendo", como usado neste documento, significa "incluindo principalmente, mas não necessariamente só...". Variações da palavra "compreendendo", como "compreende", ou sinônimos como "incluindo" têm aqui
15 significados semelhantes.

A palavra "gene", neste contexto, refere-se a uma região definida em um genoma e que pode conter sequências reguladoras de ácidos nucleicos responsáveis pelo controle da expressão, isto é, transcrição e translação da porção codificadora. Um
20 gene pode, também, incluir outras sequências 5' e 3' não traduzidas e sequências terminadoras. Outros elementos passíveis de estarem presentes são, por exemplo, os íntrons.

25 Como utilizado aqui, o termo "homólogo" no contexto de proteínas significa aquelas que possuem, substancialmente, as mesmas funções e propriedades semelhantes em espécies diferentes, e que, pelo menos em regiões, compartilham a identidade de, pelo menos, 50% dos aminoácidos. Essas
30 proteínas homólogas podem compartilhar, ao longo de suas sequências completas de aminoácidos, pelo menos 30% de identidade neles, ao menos 40% de identidade, no mínimo 50% de identidade, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ao

menos 90%, no mínimo 95% de identidade dos aminoácidos. De modo similar, de moléculas de ácidos nucleicos homólogas são aquelas que codificam proteínas, que possuem funções substancialmente iguais e propriedades semelhantes em diferentes espécies, e cujas proteínas codificadas partilham, pelo menos em regiões, no mínimo 50% de identidade de aminoácidos (tais ácidos nucleicos homólogos podem compartilhar parcela significativamente menor que 50% de identidade devido a degenerações no código genético, e diferenças no uso preferencial do códon entre gêneros e espécies diferentes de plantas), e podem compartilhar, pelo menos, cerca de 30% de aminoácidos idênticos, ao menos 40%, no mínimo 50%, pelo menos 60% de identidade, ao menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou, pelo menos, 95% de identidade nas sequências completas de aminoácidos codificados.

Como usado aqui, o termo "mutação" significa qualquer mudança em uma molécula de polipeptídeo ou de ácido nucleico, em relação às moléculas originais de que deriva o mutante e podem, por exemplo, compreender alterações únicas ou múltiplas em aminoácido ou nucleotídeo, ou em ambos, incluindo mutações pontuais, nulas e frame-shift podendo, ainda, envolver exclusões, ou inserções, ou substituições de um ou mais ácidos nucleicos ou aminoácidos, os quais podem incluir nucleotídeos ou aminoácidos de ocorrência natural ou não natural, bem como seus análogos.

Neste contexto, um "ácido nucleico" se refere à desoxiribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e seus polímeros nas formas de hélices simples, duplas ou triplas. O termo pode incluir, também, ácidos nucleicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais com propriedades semelhantes de ligação relativamente ao ácido nucleico de referência. Uma sequência específica de ácidos nucleicos pode, ainda, englobar, implicitamente, variantes conservativamente modificadas (p/ex., substituições degeneradas de códon) e

sequências complementares. Os termos "ácido nucléico", "sequência de ácidos nucléicos" ou "polinucleotídeo" também podem ser usadas como sinônimos de gene, cDNA e mRNA codificados por um gene.

5

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" podem, aqui, ser intercambiados entre si para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Incluem-se o escopo desses termos os polímeros em que um ou mais resíduos de aminoácidos podem incluir análogo(s) químico(s) artificial(is) do(s)correspondente(s) aminoácido(s) de ocorrência natural, bem como polímeros naturais de aminoácidos, assim como podem substituí-los. Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" também podem incluir polímeros contendo modificações como glicosilação, ligação a lipídio, sulfatação, gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação e ADP-ribosilação, entre outras.

Os termos *SAL1* e *fry1*, como usados aqui, são intercambiáveis, assim como os termos *SAL1* e *fry1*, pois eles referem-se à mesma proteína e sequência codificadora de nucleotídeos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseaada na descoberta de que plantas com mutações no gene codificador de *SAL1* possuem maior tolerância so estresse, incluindo a resistência à seca.

A proteína *SAL1* é bifuncional, com atividades de polifosfato de inositol fosfatase-1 e 3'(2'),5'-bifosfato de nucleotidase, e participa do catabolismo de IP_3 , uma pequena molécula envolvida na sinalização do estresse. Há uma variedade de inositol fosfatases, ou PTases, as quais quebram os fosfatos em diversas posições nas moléculas de IP_3 . Essas

diferentes atividades, embora resultem todas em uma diminuição em IP_3 , com frequência resultam em fenótipos distintos, possivelmente porque levam a diferentes funções dos produtos de hidrólise (como $I(1,4)P_2$ e $I(4,5)P_2$). As diferenças fenotípicas também podem ser devidas a atividades secundárias dessas enzimas, que receberam menor atenção, como a atividade de nucleotidase da SAL1. Além disso, localização e diferenças nos níveis de expressão das enzimas podem afetar os fenótipos. Surpreendentemente, SAL1 tem atividade relativamente baixa, *in vitro*, contra IP_3 (particularmente quando comparada a sua atividade como nucleotidase).

Diversos mutantes de SAL1 foram isolados, e são chamados *fry1* (*fieryl1*; Ishitani, M., L.M. Xiong. et al. (1997) "Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways", *Plant Cell* **9**(11): 1935-1949; Xiong, L.M., B.H. Lee et al. (2001) "FIERY1 encoding na inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*", *Genes & Development* **15**(15): 1971-1984) or *hos2* mutants (*high expression of osmotic stress regulated gene expression2*; Lee, H., L. Xiong et al. (1999), "Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in na *Arabidopsis thaliana* mutant", *The Plant Journal* **17**(3): 301-308; Xiong, L., H. Lee et al (2004), "A single amino acid substitution in the *Arabidopsis* FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance", *The Plant Journal* **40**: 536-545). Como relatado anteriormente, esses mutantes foram isolados em uma tela para expressão modificada do gene de resposta ao estresse RD29A. O mutante *fry1-1* possui maior expressão de RD29A sob condições normais e após estresse por frio, sal e osmose, assim como após tratamento com ABA. Este comportamento foi apontado como devido a uma mutação pontual que resulta em um códon final no sexto exon da proteína SAL1 (At5g63980), levando a uma proteína truncada, que não possui uma α -hélice conservada contendo um motivo WD-X₁₁-GG,

necessário para coordenação de íons metálicos e fosfato, e também para ativação nucleofílica da água. Em consequência, a proteína não possui atividade contra IP_3 ou PAP. O mutante *fry1-1* foi descrito como tendo maior sensibilidade aos estresses salino, por frio e osmótico (Xiong et al., 2001). Expressões genéticas em resposta ao estresse, como HSP70 (At1g16030), COR15A (At2g42540), KIN1 (At5g15960) e ADH (At1g77120) também aumentaram no mutante, em comparação com a espécie nativa em resposta ao estresse (Xiong et al., 2001) levando a crer que SAL1 atua como um regulador negativo das rotas de resposta ao estresse. Outros mutantes *fry1*, *fry1-2* e *fry1-3*, também como descritos como mutantes nulos com características semelhantes (Xiong et al., 2001). O mutante *hos2-1* é sensível à temperatura e sua expressão genética em resposta ao estresse é alterada sob baixas temperaturas e é sensível ao estresse pelo frio (Xiong et al., 2004). A expressão genética desse mutante não é alterada sob condições normais, nem por estresse osmótico ou or ABA, em comparação com as plantas nativas (Lee et al., 1999). Não foi relatada a tolerância dos mutantes *fry1* e *hos2* à seca, salinidade, luz, frio ou calor.

Os autores da presente invenção isolaram, anteriormente, o mutante *alx8* de *Arabidopsis thaliana* em uma tela mutante para indução alterada da enzima antioxidante ascorbato peroxidase 2 (APX2), sob condições normais e após estresse por alta luminosidade. O mutante *alx8* apresenta expressão aumentada de APX2 em ambas as condições, bem como morfologia foliar alterada e maior tolerância à seca (Rossel, J.B., P.B. Walter, et al. (2006), "A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance", *Plant, Cell and Environment* **29**(2): 269-281). Concluiu-se que essas características são co-segregadoras, indicando que elas resultam de uma mutação de ponto único. Achou-se, também, que *alx8* possui expressão alterada de vários genes de resposta ao

estresse, indicando regulação diferencial de múltiplas rotas envolvidas na sinalização da resposta ao estresse por seca em *Arabidopsis*. No entanto, a natureza deste mutante ainda não havia sido determinada até o presente. Após clonagem posicional do mutante descobriu-se que a mutação reside no gene SAL1, previamente caracterizado. Investigações recentes sobre o mutante nulo desse gene, *fry1-1*, mostraram que ele também é mais tolerante à seca. Outro mutante de *Arabidopsis thaliana*, chamado *Salk_020882*, que contém um inserto de T-DNA de aproximadamente 10kb no gene SAL1, também foi estudado e mostrou-se mais tolerante à seca do que as plantas nativas. Logo, há um potencial para aumento da tolerância à seca de plantas importantes do ponto de vista agrícola, através da expressão modificada de seus genes.

Sendo assim, a presente invenção fornece um método para obtenção de uma planta com maior resistência ao estresse, em relação à planta nativa, compreendendo: (a) introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células vegetais, que resultem em menor atividade associada à SAL1, ou um seu homólogo, na(s) referida(s) célula(s); (b) geração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); (c) seleção de uma ou mais plantas com resistência aumentada ao estresse, em relação à planta nativa. De acordo com uma modalidade, o método inclui a introdução de pelo menos uma mutação no gene SAL1 - ou seu homólogo - ou inibição, ou supressão da expressão do gene SAL1 ou de seu homólogo.

Uma mutação que resulte em menor atividade associada à SAL1 ou seu homólogo na(s) referida(s) célula(s) pode ser introduzida por quaisquer métodos adequados conhecidos. Tais métodos podem, por exemplo, incluir a exposição de uma ou mais células vegetais (que podem ser células de sementes, ou de partes da planta, ou células isoladas) a meios mutagênicos químicos ou físicos, ou meios mutagênicos por inserção, como

transposons, retrotransposons, retrovírus ou T-DNA. Materiais e métodos aceitáveis para introduzir mutação no genoma de uma planta estão descritos, por exemplo, na publicação de patente internacional WO 98/26082, em "Arabidopsis Protocols" (2nd Edition, Salinas, J. and Sanchez-Serrano, J., eds., Methods in Molecular Biology 323 (2006), Humana Press) e em "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel et al. (eds.), John Wiley & Sons (2000)), aqui incorporados por referência.

10 A mutação também pode ser introduzida em uma ou mais células vegetais cruzando-se uma planta nativa com outra compreendendo uma mutação (como determinado previamente por seleção genética e/ou análise - plantas compreendendo uma mutação desejada podem já estar disponíveis em
15 coleções/variedades de germoplasma/cultura/sementes); plantas podem ser geradas a partir da semente resultante e, em seguida, selecionadas para transmissão da mutação.

De acordo com uma modalidade da invenção, uma mutação é
20 introduzida em uma sequência nucleotídica codificadora de SAL1, ou de um seu homólogo, na(s) referida(s) célula(s) vegetal(is), e pode compreender uma inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos na sequência codificadora de SAL1, ou de um seu homólogo. Em uma
25 modalidade, a mutação é uma mutação nula de SAL1. Alternativamente, a mutação pode resultar em um produto expresso que possui, pelo menos, uma atividade reduzida associada com SAL1 ou um seu homólogo. Mutações SAL1 identificadas no decorrer do presente estudo, que resultaram,
30 pelo menos, em maior resistência à seca de plantas *Arabidopsis thaliana*, em relação à planta nativa, incluem os mutantes *fry1-1*, *alx8* e *Salk_02882*. A mutação *fry1-1* resulta em mudança do 341º aminoácido a partir de triptofano até um códon final, levando a uma proteína truncada, que não possui uma hélice $\alpha 5$,
35 necessária à atividade enzimática (At5g63980). O mutante *alx8* possui uma mutação pontual envolvendo uma troca de guanina para adenina no 1226º par de bases da sequência genômica.

At5g63980.1 (Sequência TAIR: 4010730406 (17 de abril de 2007), acesso n. NM_125794.4: posição 1226 da SEQ ID No.1). O mutante *alx8* expressa uma proteína SAL1 mutante, que possui uma troca de glicina por ácido aspártico na posição 217 da sequência de aminoácidos (Sequência TAIR: 4010745380 (16 de agosto de 2007), acesso n. NP_201203.2, SEQ ID No.2), e o mutante *Salk_02882* possui uma inserção de T-DNA de, aproximadamente, 10kb entre as posições 734 e 735 da SEQ ID No.1 ou substituindo os nucleotídeos 735 a 745 da SEQ ID No.1. Outros mutantes, que se espera tenham maior resistência ao estresse - incluindo resistência à seca - são *fry1-2*, *fry1-3* e *hos2*. O mutante *fry1-2* possui uma mudança de guanina para adenina no par de bases 736 da sequência genômica At5g63980.1 (Sequência TAIR: 4010730406, acesso n. NM_125794.4: posição 736 da SEQ ID No.1), que resulta na substituição do resíduo de ácido glutâmico na posição 126 (SEQ ID No.2) por uma lisina, resultando em uma proteína inativa. O mutante *fry1-3* possui uma inserção de T-DNA de 6,7 kb entre o quinto e o sexto exons no 1518° par de bases da sequência genômica At5g63980.1 (Sequência TAIR: 4010730406, acesso n. NM_125794.4: posição 1518 da SEQ ID No.1), que resulta na não transcrição do RNA. O mutante *hos2-1* possui uma mudança de citosina para timina no 731° par de bases da sequência genômica At5g63980.1 (Sequência TAIR: 4010730406, acesso n. NM_125794.4: posição 731 da SEQ ID No.1), que resulta no deslocamento de um resíduo de alanina na posição 124 (SEQ ID No.2) por uma valina, levando a uma proteína expressa com atividade sensível à temperatura.

Outros mutantes de SAL1, ou seus homólogos, podem ser obtidos ou gerados por meio de experimentos de rotina, baseados nas informações disponibilizadas aqui e, por exemplo, o alto grau de conservação que essa sequência nucleotídica (e proteína codificada) apresenta - ver, p/ex., Figuras 5 e 6.

Os métodos da presente invenção podem empregar qualquer agente mutagênico conhecido (utilizando métodos também conhecidos), entre os quais se incluem, mas não se limitam a luz ultravioleta, raios-X, mutagênese por radiação gama ou nêutrons rápidos, N-etil-N-nitrosouréia (ENU), metilnitrosouréia (MNU), procarbazina (PRC), trietilenomelamina (TEM), monômero de acrilamida (AA), clorambucila (CHL), melfalam (MLP), ciclofosfamida (CPP), sulfato de dietila (DES), sulfonato de etilmetano (SEM), sulfonato de metilmetano (MMS), 6-mercaptopurina (6-MP), mitomicina-C (MMC), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), $^3\text{H}_2\text{O}$ e uretana (UR).

A frequência da modificação genética após exposição a um ou mais agentes mutagênicos pode ser modulada variando-se a dose e/ou a repetição do tratamento, e pode ser adaptada a uma aplicação em particular. Em uma modalidade, a dose e o regime de tratamento não induzem citotoxicidade substancial a uma ou mais células.

20

Mutações em SAL1 ou seus homólogos podem ser detectadas e acompanhadas (por gerações) usando sequências conhecidas de SAL1 DNA como sondas, por meio de técnicas bem conhecidas no meio, e também usando sondas ou primers adequados basados na sequência genética ou nucleotídica codificadora de SAL1 ou de seus homólogos. Se a mutação estiver em um gene diferente de SAL1, a mutação pode precisar ser identificada, localizada e/ou caracterizada antes de ser acompanhada através das gerações de plantas. As pessoas versadas na técnica conhecem métodos adequados para identificação, localização e caracterização de mutações desconhecidas; estes estão descritos em diversos textos-padrão, bastante conhecidos, como Sambrook, J. et al., *"Molecular Cloning"*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Sambrook, J and Russell, D.W. (2001), *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências lá citadas; e Ausubel et al. (eds.) *"Current Protocols in Molecular*

Biology", John Wiley & Sons (2000). Ver também, Rossel, J.B., Cuttriss, A. and Pogson, B.J. "Identifying photoprotection Mutants in *Arabidopsis thaliana*" in *Methods in Molecular Biology* **274**: 287-299 (Carpentier, R. ed., Humana Press).

- 5 Métodos mais recentes para identificação de alelos mutantes incluem "Tilling" e fusões de alta resolução (HRMs).

"Tilling" (do ingles Targeting Induced Local Lesions in Genomes, Lesões locais alvo-induzidas em genomas) é um método
 10 de biologia molecular, que permite a identificação direta das mutações em um gene específico. O método combina uma técnica padrão (por exemplo, mutagênese com uma substância química, p/ex., metanosulfonato de etila (EMS)) com uma técnica sensível de seleção de DNA, que identifique mutações de base
 15 única (também chamadas mutações pontuais) em um gene escolhido. A primeira publicação descrevendo a técnica de "Tilling" em *Arabidopsis* (McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S, "Targeted screening for induced mutations", *Nat. Biotechnology* (2000) Apr; **18**(4): 455-7, aqui incorporada por
 20 referência cruzada), usava dHPLC HPLC para identificar as mutações. O método foi tornado mais eficiente pelo uso da enzima de restrição Cel-1 com um sistema baseado em gel para identificar os mutantes (Colbert, T., Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S, "High throughput screening for induced point
 25 mutations", *Plant Physiol.* (2001) Jun; **126**(2): 480-4, também aqui incorporada por referência cruzada). Outros métodos para detecção de mutações, como o ressequenciamento de DNA, foram combinados com "Tilling". Este tem sido desde então utilizado
 30 como um método de genética reversa em outros organismos como zebrafish, milho, trigo, arroz, soja, tomate e alface. Ver também: McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S, "Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics", *Plant Physiol.* (2000) Jun; **123**(2):
 35 439-42; Colbert, T., Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S, "High throughput screening for induced point mutations", *Plant Physiol.* (2001)

Jun; **126**(2): 480-4; Draper BW, McCallum CM, Stout JL, Slade AJ, Moens CB, "A high throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)-induced point mutations in zebrafish", *Methods Cell Biol.* (2004) , **77**:91-112; and Slade
 5 AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, SteineMN, Facciotti D, "A Reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING", *Nat. Biotechnol.* (2005), Jan; **23**(1): 75-81, aqui incorporados, também, por referência cruzada.

10 HRM (do inglês High Resolution Melt, Fusão de Alta Resolução) é um desenvolvimento recente, que pode aumentar muito a utilidade da tradicional análise de fusão de DNA, aproveitando-se de melhorias recentes nos equipamentos de fusão de alta resolução e do desenvolvimento de corantes
 15 específicos para ligação de dupla fita de DNA (dsDNA), que podem ser utilizados em concentrações suficientemente altas para saturar todos os sítios de fita dupla produzidos durante amplificações PCR (ver http://www.corbettlifescience.com/control.cfm?page=Introduction_4&bhcp=1), e Dufresne SD, Belloni DR, Wells WA, Tsongalis GJ, "BRCA1 and BRCA2 Mutation Screening using SmartCyclerII high-resolution melt curve analysis", *Arch Pathol Lab Med* (2006) **130**: 185-187; Graham R, Liew M, Meadows C, Lyon E, Wittwer CT, "Distinguishing different DNA heterozygotes by
 25 high resolution melting", *Clinical Chemistry* (2005) **51**:1295:1298; Hermann MG, Durtschl JD, Bromley K, Wittwer CT, Voelkerding KV, "Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes", *Clinical Chemistry* (2006) **52**:494:503;
 30 Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C, "Genotyping of single nucleotide polymorphisms by high resolution melting of small amplicons", *Clinical Chemistry* (2004) **50**:1156-1164; Margraf RL, Mao R, Highsmith WE, Holtegarde LM, Wittwer CT, "Mutation Scanning of the RET protooncogene using high resolution melting analysis",
 35 *Clinical Chemistry* (2006) **52**:138-141; NGRL (Wessex) Reference Reagent Report January 2006, "Plasmid-based generic mutation

detection reference reagents; production and performance indicator field trial" (www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm); NGRL (Wessex) Reference Reagent Report January 2006. "Production and field trial evaluation of reference reagents for mutation screening of BRCA1, BRCA2, hMLH1 and MSH2" (www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm); NGRL (Wessex) Reference Reagent Report June 2006, "Mutation Scanning by High Resolution Melts: Evaluation of Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science), HR-1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology)" (www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm); Reed GH, Wittwer CT, "Sensitivity and Specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high resolution melting analysis", *Clinical Chemistry* (2004) **50**:1748-1754; Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ, "Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit activating mutations by high resolution amplicon melting analysis", *Human Pathology* (2005) **36**:486-493; Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ, "High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen", *Clinical Chemistry* (2003) **49**:853-860; Worm J, Aggerholm A, Guldberg P, "In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis", *Clinical Chemistry* (2001) **47**:1183-1189; Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT, "Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye", *Clinical Chemistry* (2004) **50**:1328-1335; and Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor L, Wittner CT, "High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutant scanning and genotyping in solution", *Clinical Chemistry* (2005) **51**:1770-1777.

Primers de oligonucleotídeos podem ser projetados, ou outras técnicas podem ser aplicadas para selecionar linhas para mutações/inserções no gene SAL1 ou seu homólogo. Através de melhoramento genético pode-se, então, desenvolver uma linhagem vegetal homozigota para a cópia mutada do gene SAL1 ou de seu homólogo. Primers PCR para esse fim podem ser projetados de modo que uma grande parte da sequência codificadora do gene SAL1 (ou de seu homólogo) seja

amplificada especificamente, usando a sequência do gene SAL1, ou de seu homólogo, da espécie a ser sondada (ver, p/ex., Baumann et al., (1998), "Successful PCR-based reverse genetic screens using the En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent", *Theor. Appl. Genet.* **97**:729-734).

Outros mutantes semelhantes a SAL1 podem ser isolados de populações mutantes ou germoplasmas existentes usando fenótipos distintivos caracterizados conforme a presente invenção (tais como tolerância à seca, reduzida atividade associada à SAL-1, ou alterações da expressão genética em comparação com as plantas nativas). Após um período de crescimento adequado e aplicação de um estresse abiótico apropriado, como privação de água, as plantas podem ser selecionadas quanto ao fenótipo do mutante de SAL1. Se o fenótipo é causado por mutação em SAL1 ou um seu homólogo pode, então, ser estabelecido por meios moleculares bem conhecidos.

Mutantes semelhantes a SAL1, incluindo heterozigotos para o alelo, e que podem não expressar fenótipos resistentes ao estresse, também podem ser selecionados, como descrito mais adiante; esses mutantes podem ser usados em programas de melhoramento genético para introgressão de uma mutação na linhagem homozigota, ou o gene mutante ser isolado e usado em técnicas recombinantes para geração de plantas mutantes.

Enquanto os mutantes da presente invenção podem ser gerados por mutagênese aleatória (ou podem já existir), qualquer planta pode ser engenheirada por recombinação para apresentar um fenótipo semelhante, uma vez que, por exemplo, a base genética da mutação - como um gene SAL1 mutado - tenha sido determinado. Para uma descrição geral de transformação e regeneração vegetal consultar, p/ex., Walbot et al. (1983) in "Genetic Engineering of Plants", Kosuge et al. (eds.) Plenum

Publishing Corporation, 1983, e "Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods", Gamborg and Phillips (eds.), Springer-Verlag, Berlin (1995). Ver também, Sambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1989),
 5 Sambrook, J and Russell, D.W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências lá citadas; ver, ainda, Ausubel et al. (eds) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2000).

10

Um método da invenção pode, por exemplo, incluir a inserção em uma ou mais células vegetais de ácido nucléico exógeno, que iniba a expressão da atividade do SAL1 endógeno ou de um seu homólogo (p/ex., através de regiões reguladoras
 15 que controlem a expressão de SAL1 ou de um seu homólogo, da sequência codificadora de SAL1 ou de um seu homólogo, ou de mRNA traduzido a partir da sequência codificadora de SAL1 ou de um seu homólogo), ou que substitua a expressão de SAL1 endógeno, ou de um seu homólogo, pela expressão de uma
 20 proteína exógena. Esta pode ser um mutante exógeno de SAL1, ou de um seu homólogo, ou qualquer outra proteína adequada, tal como uma proteína que forneça um fenótipo selecionável.

Em uma modalidade, o ácido nucléico exógeno pode incluir
 25 um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que introduza uma mutação compreendendo inserções, exclusões ou substituições, únicas ou múltiplas de nucleotídeos na sequência nucleotídica endógena codificadora de SAL1, ou de um seu homólogo, via recombinação homóloga.

30

Inserções, exclusões ou substituições únicas ou múltiplas de nucleotídeos podem ser feitas por recombinação do sítio-alvo de mutação com uma sequência introduzida de nucleotídeos alvos. Tal sequência pode, por exemplo, incluir uma sequência
 35 de nucleotídeos a ser introduzida no genoma, flanqueada, de

ambos os lados, por sequências de nucleotídeos homólogos às sequências alvos contíguas ou localizadas de cada lado de um ponto desejado para inserção da mutação. Assim, com os métodos da presente invenção, uma sequência nucleotídica a ser introduzida no genoma pode incluir, também, um marcador selecionável ligado, operacionalmente, às regiões reguladoras desejadas (que podem incluir, por exemplo, um promotor induzível por estresse).

10 As sequências nucleotídicas homólogas às sequências alvos podem ser isogênicas a estas de modo a promover a frequência de recombinações homólogas.

15 Sequências de nucleotídeos homólogas que não sejam estritamente isogênicas às sequências alvos também podem ser usadas. Embora defasagens entre as sequências possam afetar negativamente a frequência de recombinação homóloga, a isogenia não é estritamente necessária, podendo uma homologia substancial ser suficiente. Para os objetivos da presente invenção, o nível de homologia entre as sequências homologias e as sequências alvos pode ser de, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95%, ao menos 99% ou 100% de identidade.

25 Uma sequência alvo de nucleotídeos pode ser compreendida em um vetor. Vetores representativos incluem plasmídeos, cosmídeos e vetores virais; podem incluir, também, ácidos nucléicos que contenham elementos de controle de expressão, como os sinais de controle de transcrição/translação, origens de replicação, sinais de poliadenilação, sítios internos de entrada de ribossomos, promotores, melhoradores, etc., em que os elementos de controle são associados operacionalmente com um ácido nucléico codificador de um produto genético. A seleção desses e de outros vetores comuns é convencional e 35 várias dessas sequências podem ser derivadas de vetores

comercialmente disponíveis. Ver, por exemplo, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências lá contidas; ver também, Ausubel et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000).

Um vetor alvo pode ser introduzido nas células alvo através de qualquer método adequado conhecido para introdução de DNA em células, incluindo microinjeção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, entrega mediada por lipossomo, infecção viral, fusão protoplasmática e retenção mediada por partícula.

Opcionalmente, co-administra-se um DNA alvo e uma recombinase - por exemplo, recA - a uma célula alvo de modo a aumentar a taxa de recombinação homóloga. A(s) célula(s) alvo(s) podem já conter, ou ter sido transformadas para conter, sequências alvo de recombinase adequadas, se necessário. Por exemplo, uma proteína recombinase pode ser carregada em um DNA alvo como descrito na patente norte-americana de n. 6,255,113. Para aumentar o processo de carregamento, um DNA alvo pode conter uma ou mais sequências de nucleação recombinogênica. Um DNA alvo também pode ser coberto com uma proteína recombinase por meio de pré-incubação do polinucleotídeo alvo com uma recombinase de modo que esta se ligue àquele não covalentemente. Ver, por exemplo, A. Vergunst et al. (1998), *Nucleic Acids Res.* **26**:2729 e A. Vergunst and P. Hooykaas (1998), *Plant Molec. Biol.* **38**:393-406, publicações das patentes internacionais WO 99/25821, WO 99/25840, WO 99/25855 e WO 99/25854, e patentes norte-americanas de números 5,780,296; 6,255,113 e 6,686,515.

De acordo com uma modalidade alternativa para execução de um método da invenção, uma planta com maior resistência ao estresse em relação à planta nativa pode ser criada inibindo-se a translação de SAL1 mRNA (ou um seu homólogo) por técnicas de interferência de RNA (RNAi), antisenso ou silenciador de gene pós-transcricional. O gene SAL1, ou um seu homólogo, obtido da espécie escolhida por sub-regulação (ou um fragmento dela) pode ser utilizado para controlar a produção da proteína codificada. Moléculas antisense de comprimento integral podem ser usadas para esse fim. Alternativamente, oligonucleotídeos de dupla fita, oligonucleotídeos de senso e antisenso, ou uma combinação destes, escolhidos para regiões específicas do RNA codificado por SAL1 podem ser utilizados. O uso de moléculas de oligonucleotídeos para reduzir os níveis de expressão de um gene pré-determinado é conhecido na técnica (ver, por exemplo, Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999), "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants", *Science* **286**:950-952; Waterhouse P.M. et al. (1998), "Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13959-13964; e publicações internacionais de patentes WO 99/53050, WO 99/49029, WO 99/32619). Moléculas de oligonucleotídeos podem ser fornecidas *in situ* pela transformação de células vegetais com um constructo de DNA que, após transcrição, produza sequências de RNA de fita dupla e/ou antisenso, as quais podem ser sequências parciais ou de tamanho integral. O efeito silenciador de gene pode ser aumentado pela super produção de sequências de senso e/ou antisenso (as quais podem ser parciais ou de tamanho integral) de modo que uma grande quantidade de dsRNA seja produzida.

Plantas transgênicas com um dos transgenes mencionados acima podem ser geradas pelos métodos padrão de transformação conhecidos pelos versados na técnica como, por exemplo, transformação mediada por *Agrobacterium*, tratamento de

protoplasma com cátion ou polipropilenoglicol, eletroporação, bombardeamento por micropartículas, agitação de suspensões de células em solução com microbolhas ou micropartículas cobertas com o DNA de transformação, manipulação direta de DNA, manipulação de DNA mediada por lipossomos, e outros similares. Tais métodos estão descritos em diversos textos disponíveis ao público como "Methods for Plant Molecular Biology" (Weissbach & Weissbach, Eds., 1988); Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*" *Plant J* **16**, 735-743; "Methods in Plant Molecular Biology" (Schuler & Zielinski, Eds., 1989); "Plant Molecular Biology Manual" (Gelvin, Schilperoort, Verma, eds., 1993); and "Methods in Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual" (Maliga, Klessig, Cashmore, Gruissem & Varner, eds., 1994). Ver também, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press e referências lá citadas; ver, ainda, Ausubel et al. (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000). Essas referências estão aqui incorporadas por referência cruzada.

O método preferido de transformação pode depender da planta a ser transformada. Vetores *Agrobacterium* são usados, geralmente, para transformar espécies de dicotiledôneas. Para transformação nuclear de monocotiledôneas utiliza-se, em geral, o bombardeamento biobalístico com partículas cobertas com o DNA transformador e fibras de sílica cobertas com o DNA transformador. Mas transformações mediadas por *Agrobacterium* de espécies de monocotiledôneas, inclusive trigo, já são conhecidas (ver, p/ex., a publicação de patente internacional WO 97/48814, Hiei, Y et al (1994), *Plant J* **6**(2):271-282, e a publicação de patente internacional WO 92/06205).

Constructos de DNA para transformação de uma planta selecionada incluem uma sequência codificadora de interesse ligada, operacionalmente, às sequências reguladoras 5' (p/ex., promotores e sequências reguladoras translacionais) e 3' (p/ex., terminadores) adequadas. Em uma modalidade preferencial, a região codificadora é colocada sob um poderoso promotor constitutivo, como o vírus mosaico da couve-flor (CaMV) 35S ou o vírus mosaico da escrofulária 35S. Outros promotores constitutivos escolhidos para uso na presente invenção incluem, entre outros, o da T-DNA manopina sintetase, da nopalina sintase (NOS) e da octopina sintase (OCS).

Plantas transgênicas expressando uma sequência senso ou antisense codificadora de SAL1 sob um promotor indutível também estão incluídas no escopo da presente invenção. Promotores indutíveis por estresse, como os indutíveis por alta luminosidade, seca, salinidade ou temperatura, são particularmente incluídos na presente invenção. Os promotores passíveis de serem usados de acordo com a invenção podem incluir, por exemplo, promotores genéticos de pequenas subunidades de ribulose bifosfato carboxilase (RuBisCo), ou promotores genéticos de proteína ligada a clorofila a/b para expressão em tecido fotossintético, os diversos promotores genéticos de proteína de estocagem em sementes para expressão nestas, ou os promotores genéticos de glutamina sintetase específicos de raízes para expressão no sistema radicular da planta transformada.

A região codificadora também pode ser ligada, operacionalmente, a uma sequência reguladora 3' apropriada. Podem ser usadas, por exemplo, as regiões de poliadenilação da nopalina sintetase (NOS) ou da octopina sintetase (OCS).

Usando um sistema de vetor binário de *Agrobacterium* para transformação, a região codificadora selecionada, sob controle de um promotor constitutivo ou indutível como descrito acima,

pode ser ligada a um marcador nuclear de resistência à droga, como p/ex., resistência à kanamicina. Outros sistemas de marcadores selecionáveis úteis incluem mas não se limitam a outros genes que conferem resistência a antibióticos (p/ex. 5 resistência a higromicina ou bialafos) ou a herbicidas (p/ex., resistência a sulfoniluréia, fosfinotricina ou glifosato).

Os métodos da presente invenção podem ser usados para transformar qualquer célula vegetal. Desse modo, podem ser 10 obtidas plantas, células vegetais, tecidos vegetais, sementes e afins, geneticamente modificados. Conforme uma modalidade, a(s) célula(s) vegetal(is) a serem transformadas podem ser selecionadas em famílias de plantas com importância econômica e/ou agrônômica, incluindo *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, 15 *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Graminae*, *Leguminosae*, *Poaceae*, *Rosaceae* ou *Solanaceae*.

Células transformadas podem ser cultivadas em plantas 20 segundo métodos convencionais conhecidos na técnica (ver, por exemplo, McCormick, S. et al. (1986), *Plant Cell Reports* 5:81-84). As plantas resultantes podem ser auto-polinizadas, polinizadas com a mesma cepa transformada ou com cepas diferentes ou hibridizadas, e a(s) planta(s) resultante(s), 25 inativa(s) ou com atividade reduzida associada ao SAL1, ou um seu homólogo, ser(em) identificada(s). Para garantir que esta característica fenotípica está sendo mantida de modo estável é necessário cultivar duas ou mais gerações. Alternativamente, em 30 plantações propagadas vegetativamente, plantas mutantes/transgênicas maduras podem ser propagadas por meio de mudas ou por técnicas de cultura de tecido, a fim de produzir plantas idênticas. A seleção de plantas mutantes/transgênicas pode ser realizada, e novas variedades obtidas e propagadas vegetativamente para uso comercial.

As plantas transformadas/mutadas pelos métodos da invenção podem ser selecionadas com base na falta da proteína SAL1, ou de um seu homólogo, ou baseada na sua atividade, ou na maior resistência ao estresse (por exemplo, à seca), usando
5 para a análise molecular sondas específicas de oligonucleotídeos e/ou amplificação do gene alvo.

De acordo com uma modalidade da invenção, a planta resultante terá maior resistência que a planta nativa à seca,
10 à salinidade, ao estresse por temperatura ou por luz, ou a qualquer outro estresse biótico ou abiótico, ou a combinações destes. Conforme uma modalidade específica da presente invenção, a planta resultante terá, pelo menos, maior resistência à seca do que a planta nativa.

15

No decorrer dos estudos aqui apresentados, observou-se que as mutações que afetam a atividade do SAL1 nas plantas também afetam, de um modo característico, seu tempo de floração e a forma das folhas; elas afetam também,
20 dramaticamente, o metabolismo das plantas mutantes em comparação com a planta nativa.

Em particular, a floração foi significativamente adiada nas mutantes SAL1 estudadas (cerca de 4 a 5 semanas, levando a
25 um atraso de cerca de 100% na floração). Dependendo da mutação ou do ácido nucléico exógeno causador do adiamento da floração e da planta onde essa mutação ou ácido nucléico exógeno foi introduzido, o atraso na floração pode variar, indo de cerca de 7 dias até 100 dias, de cerca de 14 dias até cerca de 80
30 dias, de cerca de 21 dias até cerca de 60 dias, de cerca de 25 até 50 dias, de cerca de 30 até cerca de 40 dias, de cerca de 10 dias, de aproximadamente 20 dias, cerca de 25 dias, cerca de 30 dias, cerca de 35 dias, cerca de 40 dias, cerca de 45 dias, cerca de 50 dias, cerca de 60 dias, cerca de 80 dias, ou
35 aproximadamente 100 dias. Atividade de SAL1 alterada,

incluindo super-expressão, mas não limitada a ela, também pode adiantar o início da floração por margens de tempo semelhantes.

5 O formato das folhas também foi significativamente afetado, resultando em folhas mais espessas, menores e mais arredondadas, com bordas mais lobuladas do que as das plantas nativas. A superfície das folhas observadas era, frequentemente, ondulada e o comprimento do pecíolo, menor,
10 dando ao invólucro foliar uma aparência semelhante a uma alface. A maior ondulação da superfície da folha pode aumentar o efeito de camada limite, diminuindo a transpiração.

Análise metabolômica revelou que ambos os mutantes
15 exibiam uma dramática e semelhante reprogramação do metabolismo, que incluía maiores níveis da poliamina putrescina, envolvida na tolerância ao estresse, e o acúmulo de vários derivados de carboidratos desconhecidos, potencialmente osmoprotetores.

20

São também disponibilizadas partes de plantas incluindo, entre outras, folhas, caules, raízes, tubérculos, flores, frutos e sementes obtidos das plantas obtidas pelos métodos da presente invenção.

25

Métodos para detecção de mutações em SAL1 ou homólogos destes

Seleção de uma planta quanto à presença de, pelo menos, um alelo mutante de uma sequência nucleotídica codificadora de
30 SAL1, ou de um seu homólogo, pode envolver a análise do DNA da planta utilizando como sonda ou primer capaz de se hibridizar a um gene SAL1, ou um seu homólogo, sob condições rigorosas, ao menos uma molécula de ácido nucléico adequada. De um modo mais específico, o método de seleção pode compreender o uso

de, pelo menos, um par de primers oligonucleotídicos adequados à amplificação de uma região do gene SAL1 ou de um seu homólogo, incluindo um primer direto e um reverso para detectar a presença, ou ausência, de uma mutação na referida
5 região. Esta região pode incluir o gene SAL1 completo, ou um seu homólogo, ou apenas parte dele como, por exemplo, (e em referência à Figura 10), a região nucleotídica contendo o exon 3, os íntron entre os exons 3 e 4, o exon 5, o íntron entre os exons 5 e 6, o exon 6, o íntron entre os exons 6 e 7, ou
10 qualquer combinação destes.

O DNA do espécimen a ser avaliado pode ser extraído por diversos métodos conhecidos dos versados na técnica, tais como os descritos em textos bastante conhecidos incluindo, mas não
15 se limitando, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências lá citadas, e Ausubel et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular*
20 *Biology*, John Wiley & Sons (2000), aqui incorporadas por referência cruzada. Ver, também, os métodos descritos em Lukowitz, W., Gillmor, C.S. and Sheble, W-R. (2000) "Positional Cloning in Arabidopsis: Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You" *Plant Physiology* **123**,
25 795-805 e referências lá citadas.

Uma vez que um DNA adequado tenha sido isolado, este poderá ser analisado para verificar a presença, ou ausência, de uma mutação usando qualquer método apropriado conhecido.
30 Qual método/estratégia será utilizado dependerá da especificidade desejada e da disponibilidade das sequências e/ou enzimas adequadas para análise do polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). Métodos apropriados podem envolver a detecção de produtos marcados de hibridização entre
35 uma sonda específica da mutação e, pelo menos, uma porção do gene SAL1 ou de um seu homólogo ou, mais tipicamente, por

amplificação de, pelo menos, uma porção do gene SAL1 ou de um seu homólogo utilizando um primer ou uma sonda adequada, ou ainda, utilizando um par de primers (direto e reverso) para amplificação de uma porção específica do gene SAL1 ou de um seu homólogo, seguida por um seqüenciamento direto, parcial ou completo, do DNA amplificado, ou análise RFLP deles. Pares de primers adequados para amplificar porções do gene SAL1 são apresentados na Tabela 1 (ver, também, a Figura 10). Outros primers ou pares de primers apropriados para análise do gene SAL1 ou seus homólogos podem ser projetados com base na SEQ ID No:1, na sequência fornecida por At5g63980 (sequência TAIR: 4010730406, acesso n. NM_125794.4) ou homólogos deles (ver, p/ex., a Fig. 6B).

Os métodos e reagentes para uso na reação de amplificação PCR são bem conhecidos das pessoas versadas na técnica. Protocolos e reagentes apropriados dependerão, em grande parte, de circunstâncias individuais. Orientações podem ser obtidas em várias fontes como, por exemplo, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências lá citadas, e Ausubel et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000), aqui incorporadas por referência cruzada.

Uma pessoa versada na técnica perceberá rapidamente que vários parâmetros da reação PCR poderão ser alterados sem afetar a capacidade de amplificar o produto desejado. Por exemplo, a concentração de Mg^{+2} e as temperaturas empregadas por variar. De modo similar, a quantidade de DNA genômico utilizada como template poderá ser modificada dependendo da quantidade de DNA disponível.

Outros métodos de análise do DNA amplificado para determinar a presença, ou ausência, de uma mutação são bastante conhecidos dos versados na técnica. Por exemplo, após digestão do DNA amplificado com uma enzima de restrição adequada - para detecção de uma mutação no gene SAL1 ou um seu homólogo - o DNA pode ser analisado por diversos métodos, incluindo eletroforese. De uso particular é a eletroforese por gel de agarose ou poliacrilamida, uma técnica comumente utilizada pelos versados na técnica para separação de fragmentos de DNA com base em seu tamanho. A concentração de agarose ou de poliacrilamida no gel determina, em grande parte, a sua capacidade de resolução. Sendo assim, a concentração apropriada desses componentes dependerá do tamanho dos fragmentos de DNA a serem distinguidos.

15.

A detecção e/ou determinação da existência de uma mutação no gene SAL1 ou um seu homólogo pode ser auxiliada por análise computacional utilizando-se um software adequado. Pacotes de softwares apropriados para comparação de determinadas sequências de nucleotídeos são bem conhecidas dos versados na técnica e facilmente encontrados.

20

Formas preferenciais da presente invenção serão descritas a seguir, por meio dos exemplos apenas. Essas formas estão referenciadas aos exemplos a seguir, incluindo dados comparativos, e não devem ser interpretadas, de forma alguma, como limitantes do escopo ou do espírito da invenção.

25

Exemplos

30

Exemplo 1 - Materiais e Métodos

Plantas e Condições de Crescimento

Sementes de *Arabidopsis* já transformadas por constructo do promotor APX2-gene repórter de luciferase (APX2:LUC) (Karpinski, S. et al (1999), *Science* **284**:654-657) foram

mutadas com sulfonato de etilmetano (EMS), e plantas M2 selecionadas em grupos derivados de 500 pais M1 (ver Ball, L. et al (2004), *Plant Cell* **16**:2448-2462). A seleção mutante foi efetuada usando-se um contador de luminescência para contar os

5 fótons emitidos por semente em placas de microtítulos de 96 poços, como descrito em Rossell, J.B. et al (2004), *Methods in Molecular Biology* **274**:287-300. Para confirmar a reprodutibilidade da expressão alterada de APX2, foram feitas

10 imagens de plantas *Arabidopsis* de quatro semanas, contendo APX2:LUC, utilizando-se câmara de CCD resfriada (Modelo DV 435, Andor Technology, Tokio, Japão). Antes da tomada das

15 imagens, as plantas foram borrifadas com uma solução de D-luciferina 1mM (BIOSYNTH, Staad, Suíça) contendo algumas gotas de Tween 80 e deixadas sob condições luminosas de crescimento por 5 minutos. As imagens obtidas pela câmara de

20 CCD foram analisadas através do programa ImagePro (Media Cybernetics; Carlsbad, CA, EUA). Foram identificados vários mutantes com expressão de APX2:LUC alterada, incluindo o alx8, que possui expressão aumentada de APX2:LUC, e que apresentou maior tolerância à seca e alteração no formato das folhas.

As sementes de germinação para o mutante nulo *fry1-1*, o mutante de inserção *Salk_020882* e plantas nativas (WT) Columbia foram obtidas em The Arabidopsis Biological Resource

25 Centre (Columbus, Ohio). Todas as referências a WT aqui referem-se ao ecotipo Columbia; *salk1* e *salk2* são duas plantas idênticas oriundas da geração T3 da semente de uma linhagem *Salk_020882*. O mutante *fry1-1* está na origem de C24 nativa e é o terceiro retro-cruzamento.

30

Para crescimento em canteiros, nos primeiros experimentos, algumas sementes de *Arabidopsis* foram espalhadas em solo esterilizado (1 parte de vermiculita para 4 partes de solo) em vasos (4 cm x 4 cm x 6 cm). Em experimentos

35 posteriores, as plantas foram cultivadas em solo misto (35% de musgo canadense, 19% de perlita 500, 40% de vermiculita e

1,5 g.L⁻¹ de cal). As sementes foram mantidas a 4 °C, no escuro, por 72 a 96 horas. As mudas foram, em seguida, transferidas para uma câmara de crescimento com um ciclo de 12 horas de luz (com 100-160 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹)/ 12 horas de escuro e temperatura de 21± 2 °C. Foi escolhido um ciclo de dias curtos para promover o crescimento vegetativo. Para fomentar a floração, as plantas foram cultivadas nas mesmas condições, mas com dias de 16 horas. Foi utilizado um sistema de cobertura para manter a umidade ambiental até as mudas estabilizarem. Estas foram repicadas até ficar uma por vaso, exceto para as populações de mapeamento, que foram cultivadas duas por vaso. As plantas foram fertilizadas com meio Hoaglands 0,5x aplicado uma vez a cada quinze dias (Hoaglands and Arnon, 1950). As bandejas sofreram um rodízio, das bordas para o centro da fonte luminosa, a fim de manter condições semelhantes de crescimento para todas as plantas. Também, onde possível, as plantas de um mesmo experimento foram cultivadas lado a lado, na mesma bandeja, de modo que elas experimentassem as mesmas condições de crescimento.

Para as sementes germinadas em meio de cultura de tecidos, a superfície de esterilização foi feita em fluxo laminar. As sementes foram colocadas em um tubo Eppendorf de 1,5 mL e lavadas com 1 mL de etanol 70% durante 3 minutos. Em seguida elas foram centrifugadas em centrífuga de bancada, a 14000 rpm, durante 30 segundos, e o etanol removido. As sementes foram ressuspensas e lavadas com 1 mL de solução alvejante (3% de hipoclorito de sódio, 75% de água + 1 gota de detergente Tween-20), por 5 minutos. As sementes foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições anteriores. Foram feitas cinco lavagens e cinco etapas de centrifugação, usando-se 1 mL de água esterilizada em cada lavagem e descartando-se a água após cada centrifugação. As sementes foram ressuspensas em água esterilizada antes de serem plaqueadas em Agar nutriente Murashige & Skoog (MS) (GibcoBRL, EUA) para plantas. O Agar MS foi preparado com 4,3 g/L de sais MS, 20 g/L de sacarose, 1 mL/L de vitaminas, 7 g/L de

fitoagar, e o pH ajustado a 5,8 com KOH, em água MilliQ. Onde foi necessária seleção, antibióticos foram incorporados ao agar: 30-50 µg/mL de kanamicina (MP Biomedical, Solon, OH, EUA) ou 30 µg/mL de higromicina (GibcoBRL). As placas foram embrulhadas em folhas de alumínio e deixadas a 4 °C por 72 horas para germinação; em seguida, foram colocadas em câmaras de crescimento a 21 °C, sob 24 horas de luz a 100 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹, ou cultivadas sob as mesmas condições que as plantas em canteiros.

10

Condições Estressantes

Para experimentos de estresse por seca, as bandejas foram deixadas sob condições normais de crescimento. Replicatas biológicas foram distribuídas aleatoriamente entre as bandejas e estas giradas a cada dois dias para controlar a variação da intensidade luminosa, da temperatura e da exposição ao ar. As plantas foram regadas no dia anterior ao tratamento e, no instante t=0 o excesso de água foi removido das bandejas; o que significa que as plantas iniciaram o experimento de seca com umidade relativa do solo de 100%. Cada um dos vasos foi pesado diariamente e a perda relativa de água, em percentagem, calculada como:

15

20

$$\frac{[\text{peso inicial (g)} - \text{peso atual (g)}] \times 100}{\text{peso inicial (g)}} = \text{perda relativa de água do solo (\%)}$$

Para estresse pelo frio, as plantas foram cultivadas em canteiros e expostas por 24 horas ao frio (4°C) com 1 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹ de luz.

25

Para estresse salino, as plantas cultivadas em canteiros foram regadas, por baixo, com solução de NaCl, uma vez a cada dois dias.

30

Tratamentos de Estresse de Plantas Cultivadas em Meios

As sementes foram esterilizadas normalmente antes de serem plaqueadas em meio contendo concentrações adequadas de sacarose, manitol, LiCl, NaCl ou metil-viologen. As placas foram, então, colocadas a germinar e crescer normalmente. Os efeitos sobre a germinação e o crescimento das mudas foram observados.

Manipulações de DNA

Extração de DNA de Arabidopsis

Extração de DNA bruto

A uma pequena quantidade de tecido vegetal foram adicionados 40 μ L de NaOH 0,25M. A amostra foi triturada com uma pitada de amarelo P20 até que o pigmento solubilizou-se. As amostras foram aquecidas a 100 °C durante 30 segundos antes que 40 μ L de HCl 0,25 M e 20 μ L de Tris-HCl 0,5 M, pH 8 com 0,25% de Triton X-100 fossem adicionados. As amostras foram misturadas por inversão e, em seguida, aquecidas a 100 °C durante 2 minutos.

Método de Extração para DNA

Esta extração foi adaptada a partir de Weigel and Glazebrook, Arabidopsis: a laboratory manual, (Cold Spring Harbor Press, 2002). Tecido e tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%) foram agitados em tubos de 2 mL usando um misturador e duas pérolas de vidro. Esse procedimento triturou e lisou o tecido que foi, então, centrifugado em velocidade máxima por 5 minutos, em microcentrífuga; 300 μ L do sobrenadante foram transferidos para um tubo de Eppendorf de 1,5 mL, e 300 μ L de isopropanol adicionados para precipitar o DNA. Este foi então depositado por centrifugação em velocidade máxima (centrífuga de Eppendorf) durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. O DNA foi, então,

dissolvido em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0, 1 mM).

Extração CTAB de DNA

5 Uma pequena quantidade de tecido vegetal, folha ou inflorescência, foi colhida de cada planta. Adicionaram-se, a cada amostra, 300 µL de tampão CTAB (2% (p/v) de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM), junto com um rolamento de aço de 1/8". As amostras foram, então, lisadas em TissueLyser® (Qiagen, Hilden, Alemanha) por 2 minutos, a uma frequência de 30/s. As amostras foram, em seguida, incubadas a 65 °C por tempos entre 40 minutos e várias horas. Depois que elas esfriaram, adicionaram-se 300 µL de clorofórmio e as amostras foram 15 agitadas, suavemente, em vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 14.000 rpm, e a camada superior, aquosa, transferida para um tubo de Eppendorf. Adicionaram-se 300 µL de isopropanol a cada amostra, e elas foram misturadas por inversão, diversas vezes. As amostras foram novamente 20 centrifugadas a 14.000 rpm, por 5 min, a fim de formar um precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. As amostras foram secas ao ar e, em seguida, dissolvidas em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM).

25

Adaptações para o formato de 96 poços

O método de extração CTAB foi adaptado para uso em placas de 96 poços, por centrifugação do DNA precipitado em centrífuga de bancada de 4-15 °C, com suportes para placas 30 (Qiagen, Hilden, Alemanha), e o uso de pipetas multi-canal com multi-dispensadores.

Amplificação por PCR e Eletroforese em Gel

Projeto do Primer

Além daqueles referenciados em publicações, foram projetados primers com sequências publicadas no site TAIR (www.arabidopsis.org) e o programa Primer3 (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin). Os primers foram projetados usando-se as seguintes condições: 50 mM de concentração salina; conteúdo GC de aproximadamente 50%; máxima auto-complementaridade igual a 8; e máxima 3'-auto-complementaridade igual a 3. Em geral, primers tinham uma T_m de 55-60 °C e cerca de 20bp de comprimento. A possibilidade dos primers ligarem e amplificarem outros produtos foi testada utilizando-se BLASTn para "acertos pequenos, quase exatos" no site da NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Exemplos de primers (diretos - F, e reversos - R) usados para amplificação e sequenciamento são apresentados na Tabela 1. Uma descrição em escala do gene SAL1, mostrando os íntrons, exons, locais de hibridização dos primers, e as localizações de inserção de T-DNA de *fry1-3* e *Salk_020882*, assim como mutações de *fry1-1*, *fry1-2* e *alx8* são apresentadas na Figura 10.

Tabela 1 - Primers para amplificação de porções do gene SAL1

Nome do Primer	Sequência 5'-3'	T _m (°C)
1F (SEQ ID N.: 5)	CGGACGCAAGTCTTCTTCTC	60,13
1R (SEQ ID N.: 6)	CCACCAATGAAAAGGGTTCA	60,72
2F (SEQ ID N.: 7)	CCAGTGACCGTTGCTGATTA	59,72
2R (SEQ ID N.: 8)	TGAAAATGCTCAGTGTCAGGA	59,43
3F (SEQ ID N.: 9)	ACACTTTGGCTACCGAGGAA	59,73
3R (SEQ ID N.: 10)	GTGGAGCTTTGACACCGAGT	50,31
4F (SEQ ID N.: 11)	TTCTCCTGTAAAAGTGCAAGTCTC	59,13
4R (SEQ ID N.: 12)	TGGTGAAATTCGGTGAAAGA	59,10
5F (SEQ ID N.: 13)	TGGCTTACGAGAAAGAGCTTG	59,78
5R (SEQ ID N.: 14)	AGCAAAGAAGAGGCATCCAA	59,96
6F (SEQ ID N.: 15)	CTGAGGGGAGATCAATACGC	59,65
6R (SEQ ID N.: 16)	TGCTCAGCTATGGAGTCACG	60,16
proF (SEQ ID N.: 17)	ACACGCCATCATCAATCTA	54,85
1-2R (SEQ ID N.: 18)	CCCTTTATACTTAGCCCAA	54
FRY1exon1F (SEQ ID N.: 19)	ACTCGCTGCTCGTCTCTGTC	60,00
realtimeFRY1R (SEQ ID N.: 20)	AGAACGATGCCTCTTCAGGA	59,95

Para o mapeamento SSLP, os primers foram projetados em torno do InDels, como publicado nas coleções Monsanto SNP e Ler no site TAIR. Alguns polimorfismos também foram encontrados na base de dados TAIR de polimorfismo. Os primers foram projetados para fornecer um produto de 200-300 bp, tendo uma T_m de 57 °C. A sequência da região foi tirada do BAC

apropriado. Para SNP, primers dCAPS foram projetados usando o programa on-line dCAPS Finder 2.0 (www.helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html; Neff et al, 2002), a sequência BAC adequada e o Primer 3. Primers dCAPS específicos para o mutante alx8 (que criam um sítio de restrição no mutante alx8, mas não no produto nativo, e que é reconhecido pela enzima de restrição XbaI) foram assim:

F: 5'-GAGGAAGGGAAAGTAGTTCTAG-3' (SEQ ID No.21);

R: 5'-TGCACTTTTACAGGAGAAGA-3' (SEQ ID No.22).

Os preparados foram, então, testados "in silico" em NEBCutter V2.0 www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php; Vinzce et al., (2003).

Para o vetor recombinante, primers de construção foram projetados como acima, mas o espaçador adequado e o sítio de recombinação foram adicionados à terminação 5' do primer. Os primers foram obtidos da Proligo (Lismore, Austrália) ou Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Condições de PCR Padrão

Condições de PCR padrão foram usadas para mapeamento, confirmação de constructos e seleção de populações segregadoras. Todas as reações PCR foram feitas em Peltier Thermal Cyclor (MJ Research, BIORAD, Waltham, MA, EUA) ou Palm-Cyclor (Corbett Research, Sydney, Austrália). No caso do PCR de um controle positivo não produzir nenhum produto ou produzir vários, as condições de amplificação foram otimizadas. Um gradiente com 12 temperaturas diferentes foi feito no Palm-Cyclor, com a quantidade de $MgCl_2$ variando de 1-2,5 mM e a preferência por diferentes Taq polimerases testada. Em geral, as reações tiveram os seguintes componentes: dNPTS 0,2 mM, tampão 1X Taq (conforme

necessidade), 0,5 μ M de cada primer, $MgCl_2$ 2 mM (FisherBiotech, WA, Austrália), 1-2 μ L de amostra de DNA e 0,25U Taq (se necessário). Condições típicas do ciclo foram: 2 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a T_m -2 °C, e 30s a 72 °C; 2 min a 72 °C.

Condições de PCR de Alta Fidelidade

Para seqüenciamento e produção de constructo fez-se necessário um produto PCR muito preciso e/ou extenso. Nesses casos, polimerases revisadas foram usadas conforme instruções do fabricante. Foram elas: Pfu DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), Platinum Pfx Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e Phusion High-Fidelity DNA polimerase (Finnzyme, espoo, Finlândia).

Eletroforese

Para separação e quantificação de ácido nucléico, as amostras foram corridas em gel de agarose com Precision Molecular Mass Standard Ladder (BioRad, EUA) e um Ladder de DNA de 1 kb (Promega, EUA). Uma ladder preparada de lambda DNA, digerida com HindIII e EcoRI também foi usada. Para o PCR padrão, a eletroforese foi feita em géis de agarose de 0,5-2% (p/v) (Fischer Biotech, WA, Austrália) com 0,5 ng/mL de brometo de etidium (Biorad) incorporado ao gel, para visualização. Quando foi necessária alta resolução, como no caso da separação de dCAPS, 3-4% (p/v) dos géis foram feitos com Agarose-1000 (GibcoBRL, Invitrogen, Rockville, MD, EUA). Os géis foram produzidos e a corrida feita em tampão 1X TBE (base Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) ou 1X TAE (Tris-acetato 40 mM, Na_2EDTA 20 mM, pH 8,5). A corrida foi feita em um equipamento tradicional para eletroforese ou em um sistema Super 120 de gel de alto desempenho (6 mgel, Biokeystone, El Monte, CA, EUA), que pode ser operado a até 300V. Para separação do produto de plasmídeo, 0,7-1,0% de géis foram corridos durante 6 horas, a 4 °C e 100V.

Adicionou-se tampão de carregamento (70% de glicerol, 30% de H₂O, azul de bromofenol) ao produto PCR antes do carregamento. As imagens nos géis foram tomadas sobre fonte de luz UV.

5

Purificação e Extração por Gel de Fragmentos de DNA

Antes de serem usados em ligações ou seqüenciamentos, os fragmentos de DNA foram purificados do gel de agarose e mistura PCR. O processo removeu primers, nucleotídeos, enzimas, óleos minerais, sais, agarose, brometo de etidium e outras impurezas.

Para fragmentos pequenos, de 70-10kp, Wizard® SV Gel e Sistema de Limpeza PCR, ou o kit QIAquick de extração de gel ou kits de limpeza PCR (Qiagen) foram usados conforme as instruções dos fabricantes. Em resumo, bandas apropriadas foram cortadas do gel e dissolvidas em tampão contendo isotiocianato de guanidina. O gel ou o produto PCR dissolvido foi, então, passado por coluna contendo uma membrana de sílica, em presença de sais caotrópicos. A membrana, a qual o DNA ficou ligado foi, em seguida, lavada antes que o DNA fosse eluído com dH₂O esterilizada.

Para extrair fragmentos de DNA de 100bp-10kbp do gel, a unidade de filtração centrífuga Ultrafree-DA (Millipore) foi usada também conforme as instruções do fabricante. Esse kit difere dos demais pelo fato de que o nebulizador de gel utiliza compressão deste para extrair o DNA da agarose. O DNA foi, então, purificado adicionando-se 1/10 volume de acetato de sódio 3M, misturando-se, adicionando-se 2,5 volumes de etanol 100% e precipitando o DNA a -20 °C, durante 3 horas. Este foi centrifugado em velocidade máxima durante 15 minutos, em centrífuga de bancada. O precipitado foi, então, lavado com etanol 70% e o DNA dissolvido em dH₂O esterilizada.

O kit QIAEX II foi utilizado para extrair do gel as bandas que se sabia serem maiores do que 10kb, conforme instruções do fabricante. Esse kit usa grãos de sílica para ligação ao DNA, ao invés da membrana de sílica, evitando a quebra de fragmentos maiores do DNA à medida que eles passem pela membrana.

Os rendimentos foram calculados por meio de espectrofotômetro nanodrop (Genomic Solutions, Melbourne, Austrália).

Clonagem e Complementação Posicional

DNA genômico foi extraído de uma população F2 oriunda de cruzamento entre *alx8* (origem Col-0) e Landsberg ereta nativa. O fenótipo foliar de F2, ou sua progenia para F2 nativa, foi utilizado para determinar seus genótipos no sítio de mutação *alx8*. Foi feita uma seleção inicial com marcadores descritos por Lukowitz et al (Lukowitz, W., C.S. Gillmor, et al (2000)), "Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you", *Plant Physiology* **123**(3):795-805). Os marcadores foram arranjados em torno de SSLP e SNPs encontrados na base de dados Cereon (www.arabidopsis.org). Primers dCAPS foram projetados com ajuda de dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>; Neff et al, 2002). PCR, digestão e eletroforese em gel foram realizadas usando métodos padrões.

Manipulação de Vetores

Digestão de Restrição

Todas as enzimas eram Promega e foram usadas conforme instruções do fabricante, exceto por pequenas modificações. Digestões de restrição foram efetuadas para mapeamento fino usando marcadores dCAPS. Nesse caso, 10 µL de produto PCR

foram digeridos com 1 unidade da enzima apropriada a 37 °C, durante períodos de duração de 1 hora a uma noite. Digestão de restrição de plasmídeos, como BACS, foram feitas sobre 1 µg de DNA e 5 unidades de enzima. As digestões foram interrompidas por aquecimento a 65 °C por 15 minutos, ou por resfriamento a -20 °C.

Desfosforilação

Fragmentos digeridos foram desfosforilados usando fosfatase alcalina de intestino de vitelo (CIAP; Promega) segundo instruções do fabricante. A reação foi repetida duas vezes, antes de ser interrompida com o tampão finalizador fornecido. A solução foi, então, limpa por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com acetato de sódio e etanol 100%. O precipitado foi lavado com etanol 70% antes de ser seco ao ar e ressuspenso em água esterilizada.

Vetor de ligação

Insertos e plasmídeos preparados foram ligados usando T4 ligase (Promega) conforme instruções do fabricante. A proporção 3:1 de inserto:vetor de DNA foi usada com predominância sobre 1:1 ou 1:3, e a ligação ocorreu a 4 °C, por uma noite.

Recombinações de Vetor

Para vetores que requeriam recombinação, o inserto foi amplificado usando condições de alta fidelidade e primers contendo a sequência recombinante attB. Reações de recombinação foram realizadas usando o sistema Gateway® (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Em resumo, 50 fmol de um inserto adequado foi recombinado com 50 fmol do vetor pDONR/Zeo (Invitrogen), que contém as sequências recombinantes attP correspondentes, usando 2 µL da enzima BP clonase em uma reação de 10 µL. A isso se chama reação BP, que resulta em uma sequência recombinante attL. A reação foi

deixada por uma noite a 25 °C, e interrompida por incubação com 1-2 µg de proteinase K a 37 °C durante 10 minutos. Após transformação em *E. coli* competente e incubação com seleção, o plasmídeo foi purificado e o inserto confirmado. O plasmídeo isolado foi, em seguida, recombinado com o vetor de destinação em uma reação LR. Vetores de destinação, como pHellsGate 8 (pHG8; doado por Peter Waterhouse e Chris Helliwell, PI, CSIRO), contêm as sequências recombinantes attR. Essas, então, recombinam com os sítios attL no plasmídeo doador, contendo o inserto, para fornecer attB sequências novamente. A reação LR é a mesma que BP, mas requer LR clonase. De novo, moles iguais de pDONR-inserto e pHG8 recombinaram-se por uma noite para fornecer pHG8-inserto. Este plasmídeo foi, então, usado para transformar *E. coli*, amplificada sob seleção, isolada e confirmada.

***E.Coli* competente**

Para preparar *E. coli* competente, 5 mL de LB foram inoculados com 5 µL de células DH5α e incubados por uma noite a 37 °C, com agitação moderada (200 rpm). Essa cultura iniciadora foi, então, utilizada para inocular 200 mL de LB, os quais foram incubados a 37 °C, com agitação moderada, durante 3-4 horas, até que a cultura apresentasse OD600 de 0,6. A cultura foi, então, incubada sobre gelo, por 30 minutos, antes de ser centrifugada a ~ 3.000 giros a 4 °C por 20 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 200 mL de água gelada antes de ser centrifugado novamente, nas mesmas condições. Este ciclo foi repetido mais duas vezes, sendo a última ressuspensão feita com 20 mL de glicerol 10% gelado. As células foram centrifugadas outra vez, a 4 °C, mas a 2.000 giros, durante 10 minutos, e ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% gelado. A suspensão foi, então, distribuída em alíquotas de 50 mL, as quais foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e guardadas a -80 °C.

Transformação de *E. coli*

Para transformações difíceis, foram usadas células competentes comerciais, *E. coli* quimicamente competente One Shot® OmniMAX™-T1R (Invitrogen). 100 µL de células foram descongeladas sobre gelo; adicionaram-se, então, ~100 ng de mistura de litigação, e as células foram deixadas sobre gelo durante 30 minutos antes de serem submetidas a choque térmico, 42 °C, por 30s. As células foram, em seguida, colocadas novamente em gelo por 2 minutos, antes de se adicionar 250 µL do meio SOC fornecido. Deixou-se as células voltarem à temperatura de 37 °C, com agitação, por 1-2 horas.

Para a maioria das transformações foram usadas células competentes preparadas, não comerciais. Uma alíquota de 100 µL dessas células foi descongelada sobre gelo e acrescentadas de ~100 ng de DNA de plasmídeo; misturou-se com a ponta da pipeta. As células foram, então, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido antes de serem incubadas em banho-maria, a 37 °C, por 5 minutos. Adicionou-se, então, 1 mL de LB e incubou-se a 37 °C, com agitação, por 1-2 horas. Dois volumes de células diferentes foram, em seguida, plaqueados em meio seletivo apropriado e incubados a 37 °C por uma noite.

Crescimento Bacteriano e Soluções em Glicerol

Todas as culturas bacterianas líquidas cresceram em meio Luria-Bertani (LB), feito de 10 g/L de triptona-bacto (BactoLaboratories, Austrália), 5 g/L de extrato de levedura (BactoLaboratories) e 5 g/L de NaCl em água MilliQ. Quando necessário, foram acrescentados 15 g/L de agar (Lerner Davis Gelatin, Austrália) ao caldo. Todos os meios foram esterilizados em autoclave antes do uso. Os antibióticos foram usados nas seguintes concentrações: 100 µg/mL de espectinomicina (Sigma), 100 µg/mL de ampicilina (sigma) e

150 µg/mL de rifampicina (Sigma), 30-50 µg/mL de kanamicina (MP Biomedical, Solon, OH, EUA), 50 µg/mL de zeomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para seleção de zeomicina foi utilizado LB com baixo teor de sal: 10 g/L de triptonabacto (BactoLaboratories, Austrália), 5 g/L de extrato de levedura (BactoLaboratories) e 5 g/L de NaCl em água MilliQ. Para seleção azul-branco, as placas continham, também, IPTG 0,5 mM (isopropil-b-D-tiogalactosídeo; Fisher Biotech) e 80 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo; Progen Bioscience, QLD, Austrália).

Culturas líquidas de *E. coli* foram incubadas durante a noite, a 37 °C, com agitação; placas de *E. coli* foram incubadas a 37 °C, por uma noite e placas de *Agrobacterium* foram incubadas a 28 °C por vários dias. Culturas líquidas de *Agrobacterium* foram incubadas sob agitação, a 28 °C, durante 16-20 horas.

Soluções em glicerol das culturas bacterianas foram feitas combinando 700 µL de cultura com 700 µL de solução de glicerol (glicerol 65% v/v, MgSO₄ 0,1 M, Tris-Cl 0,025 M, pH 8). As soluções foram guardadas a -80 °C.

Colônias PCR

Colônias PCR foram realizadas para testar colônias quanto à presença de plasmídeos e de insertos. As condições PCR foram as usuais, mas os volumes foram de até 20 µL por reação e transferiu-se uma pequena quantidade de células das colônias para o PCR usando uma ponteira de pipeta.

Isolamento de Plasmídeos

Para a maioria das aplicações, os plasmídeos foram isolados de 3-5 mL de culturas líquidas, crescidas durante a noite a partir de uma única colônia ou das soluções em

glicerol, utilizando-se o kit GeneElute™ Plasmid Miniprep (Sigma). Em resumo, as células foram centrifugadas e lisadas utilizando-seum método de lise modificado SDS-alcalino. O DNA do plasmídeo foi, então, adsorvido em membrana de sília, em presença de alta concentração de sais. A membrana foi, em seguida, lavada antes do DNA ser eluído com dH₂O esterilizada. Para aplicações em que foi necessária uma grande quantidade de plasmídeos, como a preparação de BAC DNA, um protocolo de lise alcalina em larga escala foi utilizado. Este baseou-se em um protocolo obtido do Laboratório de regulação Celular e Molecular, NIH (Bethesda, MA, EUA). Uma cultura de 500 mL, com seleção, foi deixada crescer por uma noite, a 37 °C e 200 rpm. 250 mL das células foram, então, centrifugados a 6000 g durante 15 minutos, a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e o frasco colocado sobre gelo. As células foram, então, ressuspensas em 20 mL de EDTA 10 mM, pH 8,0, em temperatura ambiente, e deixadas nessa temperatura por 5 minutos. 40 mL da solução de lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%) foi, então, adicionada e o frasco deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. Acrescentou-se, em seguida, 30 mL de solução de neutralização (ácido acético 11,5% (v/v), acetato de potássio 1,9 M) gelada e deixou-se o frasco sobre gelo durante 15 minutos. O debris de células foi centrifugado a 30.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro frasco e o processo repetido. O DNA foi, então, precipitado por adição de 45 mL de isopropanol e centrifugado a 6.500 g por 15 minutos. O precipitado foi dissolvido em 9 mL de tris 10 mM/EDTA 50 mM e 4,5 mL de acetato de potássio 7,5 M acrescentados. A solução foi, então, congelada a -70 °C por 30 minutos, descongelada e centrifugada a 4.000 g durante 10 minutos. O DNA foi, em seguida, precipitado pela adição de 27 mL de etanol 100%e centrifugado a 4.000 g por 10 minutos. O precipitado foi dissolvido em 700 µL de Tris 50 mM/EDTA 50 mM, pH 8,0, e 10 µL de RNase 10 ng/µL adicionados. A amostra foi, então, incubada a 37 °C por 1 hora para permitir a rutura do RNA. A

amostra foi, então, clarificada pela adição de 700 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturada e centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos, em microcentrífuga. A camada superior foi clarificada novamente, com 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico. O DNA foi, então, precipitado da camada superior pela adição de 700 µL de isopropanol e centrifugada a 14.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%, e submetido a giro de 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi, novamente, removido e o precipitado seco ao ar antes de ser ressuspense em 100 µL de H₂O esterilizada.

Diagnóstico dos Produtos

Para confirmar a identidade dos plasmídeos e a presença de insertos, os plasmídeos isolados foram digeridos por uma noite e submetidos a corrida em gel de agarose a 1%. O padrão esperado de bandas foi identificado usando-se NEBCutter V2.0 (www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php; New England Biolabs).

***Agrobacterium* Competente**

Agrobacterium tumefaciens competente foi preparado a partir de cultura de 500 mL, crescida por uma noite a 28 °C. 250 mL da cultura foram resfriados sobre gelo e centrifugados por 5 minutos a 4 °C e 3.000 g. O precipitado foi ressuspense em 1 mL de CaCl₂ 20 mM gelado e dispenso em alíquotas de 0,1 mL antes de ser congelado em nitrogênio líquido e guardado a -80 °C.

Transformação de *Agrobacterium*

Células de *Agrobacterium tumefaciens* competente preparado, não comercial, foram transformadas com o plasmídeo isolado. 100 µL das células competentes foram

descongeladas sobre gelo e ~1 µg de plasmídeo adicionado. As células foram, então, submetidas a choque térmico, 37 °C, por 5 minutos antes da adição de 1 mL de LB líquido. As células foram deixadas para alcançar a temperatura de 28 °C, sob agitação, por 2-4 horas. Um controle negativo de células de *Agrobacterium* competente sem plasmídeo foi incluído. As células foram, então, espalhadas sobre placas de Agar LB com seleção de kanamicina para o plasmídeo (50 µg/mL) e seleção de rifampicina (100 µg/mL) e gentamicina (25 µg/mL) para *Agrobacterium*. As placas foram incubadas a 28 °C por 2-3 dias, ou até aparecerem as colônias. Estas foram investigadas quanto à presença dos insertos através de colônias PCR utilizando primers específicos. Essas colônias também foram usadas para inocular uma cultura iniciadora de 5 mL de LB líquido com seleção (50 µg/mL de kanamicina, 100 µg/mL de rifampicina, 25 µg/mL de gentamicina). As colônias foram deixadas crescer por uma noite, a 28 °C, sob agitação.

Transformação de *Arabidopsis*

Arabidopsis a ser transformado foi cultivada em canteiro; seus primeiros botões foram cortados a fim de estimular o aparecimento de múltiplos botões secundários. As plantas foram inclinadas quando havia diversos cachos de flores e quaisquer cápsulas de sementes (*siliques*) desenvolvidas foram cortadas. *Arabidopsis* foi, então, transformada utilizando-se um protocolo modificado de Clough & Bent (1998). Uma cultura iniciadora de 5 mL com seleção foi usada para inocular 500 mL de LB líquido, que foi, então, deixado crescer por uma noite, a 28 °C, com agitação. A cultura de 500 mL foi centrifugada em centrífuga RC 5C Plus (Sorvall) usando um rotor SLA-300, a 4.000 rpm durante 20 minutos, a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 500 mL de solução de sacarose 5% (p/v). Em seguida, o detergente Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round ock, TX, EUA) foi adicionado até uma concentração final de 0,05%

(v/v). As flores foram mergulhadas na solução por 5-10s, com agitação leve antes de serem prensadas em uma bandeja, cobertas para manter a umidade. As plantas foram deixadas em repouso até o dia seguinte e o processo repetido uma semana depois. Depois de deixar as sementes assentarem por duas semanas, as plantas foram transferidas para um armário escuro e seco, para secar as sementes.

As sementes selecionadas foram plaqueadas para isolar transformadores, que foram, então, transferidos para canteiros.

Sequenciamento

Fragmentos de DNA ou plasmídeos foram enviados, junto com os primers apropriados, ao Biomolecular Resource facility (JCSMR, ANU, Canberra, Austrália) ou ao Australian Genomic Resource Facility (UQ, Queensland) para serem seqüenciados.

Alternativamente, DNA foi preparado em uma reação de seqüenciamento de 20 µL contendo: primer 0,5 µM, 1x de tampão, 2 µL de DNA e 1,5 µL de corante Big. A reação foi conduzida da seguinte maneira: 96 °C durante 2 minutos e 40 ciclos de: 96 °C por 5s, 50 °C por 15s, 60 °C por 3,5 minutos. O produto PCR foi, então, purificado usando purificação por EDTA. Aos 20 µL foram adicionados 5 µL de EDTA 0,125 M e 60 µL de etanol 100% em temperatura ambiente. A amostra foi misturada e deixada precipitar em temperatura ambiente, por 40 minutos, sob cobertura metalizada. O DNA marcado foi centrifugado em velocidade máxima durante 20 minutos e lavado com etanol 70% antes de ser novamente centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado seco usando um Speedi-Vac. A amostra foi, então, entregue a Yang para seqüenciamento.

PCR entrelaçado (cauda de PCR) assimétrico térmico

O protocolo foi adaptado de (Liu Y-G, Mitsukawa N, oosumi T, and Whittler, RF (1995) "Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR", *The Plant Journal* 8:457-463). Como descrito em Liu et al. 1995, foi realizado um uso sequencial de três primers (LBa1 - 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3' (SEQ ID NO: 23); LBb1 - 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3' (SEQ ID NO: 24); and LBc1 - 5'-GGACTCTTGTCCAAACTGG-3' (SEQ ID NO:25)), específico para a extremidade esquerda do inserto de T-DNA com um primer degenerado arbitrário, AD2 (5'- NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA-3', com degenerescência de 128 vezes, que se ligaria às sequências de *Arabidopsis* em uma série de três reações PCR. A reação primária foi de 20 mL e continha 1x de tampão PCR, cada dNTP 200 mM , MgCl₂ 2 mM, LBa1 0,2 mM, AD2 3 mM, F1 Ta1 0,8U, e cerca de 20 ng de DNA genômico. Foram realizadas duas reações para cada amostra: uma foi diluída 50 vezes para o próximo PCR, e a outra foi deixada para corrida sobre o gel final.

A reação secundária foi de 20 µL. Ela continha 1x de tampão PCR, cada dNTP 200 µM , MgCl₂ 2 mM, LBc1 0,2 µM, AD2 2 µM, F1 Ta1 0,6U, e 1 µL do produto PCR da reação primária. Foram realizadas duas reações para cada amostra: uma foi diluída 10 vezes para o próximo PCR, e a outra foi deixada para corrida sobre o gel final. A reação terciária foi de 100 µL e conduzida sob as mesmas condições da reação secundária, exceto pelo fato de que foram usados os terceiros primers LB específicos junto com AD2.

Todos os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Produtos específicos de inserção foram identificados por diferença de tamanho entre bandas das reações secundárias e terciárias. As bandas apropriadas foram retiradas do gel utilizando kit de

extração de gel QIAquick (Qiagen) e seqüenciadas (AGRF, Brisbane, Austrália).

Análise da proteína SAL1

5 Para produzir a proteína recombinante SAL1, o RNA total
foi extraído de folhas de Col-0 e *alx8*, usando-se o kit
Plant RNeasy com a etapa de digestão com DNase em coluna
(Qiagen, www.qiagen.org) e usado para a síntese de cDNA de
primeira linha (SuperScript II, Invitrogen,
10 www.invitrogen.com) conforme instruções do fabricante. A
sequência completa de codificação de SAL1 foi amplificada a
partir de cDNAs de SAL1 clonados de Col-0 e *alx8* com os
primers SacII-SAL1 F1 (5'-ctccgcgggtgatggcttacgagaaagagc-3') (SEQ ID
NO:26) e EcoRI-SAL1 (5'- gctcgaattctcagagagctgaagctttctc-3') (SEQ ID
15 NO:27) e, em seguida, clonados no vetor pHUE (Baker et al.,
2005). As proteínas recombinantes foram expressas na cepa
BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen, www.emdbiosciences.com) após
indução com IPTG 1 mM, e purificadas por cromatografia de
afinidade usando resina HIS-Bind, de acordo com as
20 instruções do fabricante (Novagen). Proteína SAL1 autêntica,
sem marcação, foi recuperada por clivagem enzimática e
ensaiada para atividade de fosfatase contra 5'-fosfato de
3'-fosfoadenosina (PAP) (Murguia et al., (1995), *Science*
267, 232-234); por purificação de imunoafinidade, foram
25 isolados anticorpos monoclonais anti-SAL1 (IMVS, Adelaide,
Austrália) da fração IgG do soro inoculado de coelho.

Por *western blots*, 20 µg de extrato de proteínas de
folhas foram resolvidos em um gradiente de gel,
30 eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose e
sondados, com uma diluição de 1:1000 de anticorpos
monoclonais purificados, contra a proteína SAL1
recombinante. Após lavagens com Tween PBS 0,05% (v/v), os
blots foram inoculados com diluição 1:10000 de HRP-IgG anti-
35 coelho de cabra conjugado, e desenvolvidos utilizando-se o

kit de detecção Super Signal West Femto Chemilumiscent (Pierce).

Análise da Expressão Gênica

5 Precauções tomadas ao manipular RNA

Devido à abundância de enzimas RNase no ambiente, diversas precauções foram tomadas a fim de evitar a degradação do RNA. Luvas foram sempre usadas na manipulação do RNA e cuidados tomados, no sentido de trabalhar em ambiente limpo quando possível. As amostras foram mantidas sobre gelo, guardadas a -80 °C e o número de ciclos de congelamento-descongelamento, limitados. Água livre de RNase foi obtida comercialmente ou por tratamento de H₂O MilliQ com 0,2% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma). A água tratada com DEPC foi agitada por uma noite e depois autoclavada para destruir qualquer resto de DEPC, antes de ser usada. A vidraria foi mantida em forno a 180 °C por uma noite e o material plástico, mergulhado em H₂O₂ diluída durante a noite, antes de ser enxaguada diversas vezes com água tratada com DEPC.

Extração do RNA

O RNA foi extraído usando o kit Plant RNeasy (Qiagen, Alemanha). Em resumo, não mais do que 100 mg de tecido congelado foram reduzidos a pó usando micropilões estéreis. A amostra foi lisada e desnaturada no tampão contendo isotiocianato de guanidina (GITC) disponibilizado no kit, o qual também inativa as RNases. A amostra foi, então, aplicada em um granulador QIA (QIAshredder), que remove material insolúvel e quebra DNA genômico. O eluato foi misturado com etanol 100% para precipitar o RNA, e a mistura passada por minicolumna RNeasy, onde o RNA se liga a uma membrana de gel de sílica. A membrana foi, em seguida, lavada e tratada com DNase I livre de RNase (Qiagen), por

cerca de 20 minutos, e lavada novamente antes do RNA ser eluído com H₂O livre de RNase.

Precipitação do RNA

5 Para concentrar e limpar o RNA, foi usado um protocolo obtido de Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1998). Em resumo, 1/10 de volume de acetato de sódio, pH 5,2, foi adicionado ao RNA. A amostra foi colocada em vórtex, rapidamente, para ser misturada, antes da adição de 10 2,5 volumes de etanol 100%, gelado. A amostra foi novamente misturada em vórtex e colocada a -20 °C durante 30 minutos para facilitar a precipitação do RNA. Este foi, então, centrifugado em velocidade máxima, em centrífuga de bancada, por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado 15 lavado com etanol 70% antes de ser novamente centrifugado. O sobrenadante foi removido e o RNA seco em Speedi-Vac por 5 minutos, sob calor médio, antes de ser dissolvido em H₂O livre de RNase.

Síntese de cDNA

20 A síntese de cDNA foi conduzida de acordo com um protocolo adquirido de Christian Delessert (Plant Industry, CSIRO, Canberra, Austrália). 1 µg do primer T23V foi adicionado a 1 µg de RNA e incubado a 70 °C, durante 10 25 minutos, para permitir a ligação do primer. A reação foi, então, levada a 30 µL com 1X do tampão apropriado, ditiotreitol 10 mM, dNTPs livres de RNase 0,17 mM (Invitrogen), 100 unidades de SuperScript II (Invitrogen) e H₂O livre de RNase suficiente para atingir os 30 µL. A 30 reação foi, então, incubada a 45 °C por 2 horas, e diluída a 200 µL com água MilliQ. O cDNA estava, assim, pronto para análise RT-PCR em tempo real.

Análise RT-PCR em Tempo Real

A reação de cadeia de polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR em tempo real) foi usada para medir a abundância de transcrição.

5

Projeto do Primer

Primers adequados para RT-PCR em tempo real foram projetados utilizando-se o programa Primer3 (www-genome.wi.mit.edu/CGI-bin/primer/primer3_www.cgi) com as seguintes condições:

10

Tamanho aproximado do produto 250bp

Temperatura aproximada de fusão (T_m) 60 °C

Conteúdo GC aproximado 50%

15

Auto-complementaridade máxima 4

3' auto-complementaridade máxima 3

As sequências de genes utilizadas foram as sequências unidas de cDNA, obtidas de TAIR (www.arabidopsis.org). Quando possível, os primers foram projetados de cada lado de um íntron para permitir a detecção de contaminação de DNA. A especificidade dos primers foi verificada por meio de uma pesquisa "Blastn" no site do National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todos os primers foram adquiridos de Proligo (Austrália). Exemplos de alguns dos primers utilizados são dados em (Rossel, J.B., P.B. Walter, et al. (2006), *Plant, Cell and Environment* **29**(2):269-281). Exemplos de outros primers usados incluem:

20

25

30

APX2 (At3g09640), 5'-GGCTGGGACATTTGATGTG-3' (SEQ ID NO: 28) e

5'-AGGGAACAGCTCCTTGATAGG-3' (SEQ ID NO: 29);

APX1 (At1g07890), 5'-CCACTCGCATTCTCCAGAT-3' (SEQ ID NO: 30) e
5'-TCGAAAGTTCCAGCAGAGTG-3' (SEQ ID NO: 31);

sHSP (At2g29500), 5'-CCTGGATTGAAGAAGGAGGAAG-3' (SEQ ID NO: 32) e
5'-TAGGCACCGTAACAGTCAACAC-3' (SEQ ID NO: 33);

ZAT10 (At1g27730), 5'-AGGCTCTTACATCACCAAGATTAG-3' (SEQ ID NO: 34)

e

5'-TACACTTGTAGCTCAACTTCTCCA-3' (SEQ ID NO: 35);

Ciclofilina

(At2g29960), 5'-TCTTCCTCTTCGGAGCCATA-3' (SEQ ID NO: 36) e

5'-AAGCTGGGAATGATTCGATG-3' (SEQ ID NO: 37);

DREB2A (At5g05410), 5'-AGACTATGGTTGGCCCAATG-3' (SEQ ID NO: 38) e

5'-TCGAGCTGAAACGGAGGTAT-3' (SEQ ID NO: 39);

HSP70 (At3g09440), 5'-GCTGCTATTGCTTACGGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 40) e

5'-CTCTCGGGTTTCCACTAATGTC-3' (SEQ ID NO: 41).

Para conferir a precisão e a eficiência dos primers, foi traçada uma curva padrão com 100, 25, 5 e 1 ng de cDNA, sendo cada concentração feita em duplicata. O valor R² de eficiência de reação e as curvas de fusão são automaticamente formulados pelo programa Rotorgene®5. Para os primers precisos, o valor de R² deve ser >0,99, a eficiência da reação deve ser >95% e a curva de fusão deve indicar apenas um produto sendo amplificado. Os primers foram usados no RT-PCR em tempo real somente se atenderam a essas condições.

Ajuste do RT-PCR em tempo real

As reações RT-PCR em tempo real foram conduzidas em Rotor-Gene®2000 ou Rotor-Gene®3000 (Corbett Research, Austrália). Em alguns casos, triplicatas de cada amostra de cDNA foram feitas. Alternativamente, foram feitas transcrições reversas em duplicata, e duas replicatas

técnicas de cada transcrição reversa resultaram em quatro replicatas por amostra de RNA.

5 Cada amostra foi testada com ambos os primers para o gene de interesse e aqueles para o gene housekeeper. RT-PCR em tempo real permite a quantificação da abundância de mRNA em um tecido particular após vários tratamentos, em relação ao gene housekeeper, cuja expressão não se altera. Isto é feito pela medida da taxa de amplificação dos transcriptos em 10 ciclos repetidos, medindo-se a incorporação de um corante fluorescente, verde SYBR, nos transcriptos. Esse corante liga-se a todas as moléculas de dsDNA e só emite fluorescência quando ligado.

15 Para fazer a reação, verde SYBR® JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma Aldrich) ou Roche LightCycler4800 SYBR Master (Roche, Basel, Suíça) foram utilizados, conforme instruções do fabricante. No produto Sigma, a mistura básica contém Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 3,5 mM, dNTP 20 0,2 mM cada, 0,25 unidades de Taq DNA polimerase, anticorpo JumpStart Taq e verde SYBR I. O conteúdo da mistura básica da Roche não foi disponibilizado. Uma reação típica de 10 µL conteve 25 ng de cDNA, 0,2 µM de cada primer e 0,9X da mistura básica. As condições típicas dos ciclos foram as 25 seguintes:

95 °C por 2 min (ativação inicial da Taq DNA polimerase)

30 Ciclo repetido 45 vezes: 95 °C por 15s (desnaturação), 55 °C por 30s (ligação do primer), 72 °C por 30s (alongamento e leitura da fluorescência) e 80 °C por 15s (leitura da fluorescência)

60 °C por 2min (etapa final de alongamento)

Análise da curva de fusão por aquecimento até 99 °C, com aumento de 1 °C a cada 5s.

5

Análise

Os resultados da RT-PCR em tempo real foram analisados com o programa Rotor-Gene®5 (Corbett-Research). Para cada reação, a curva de fusão foi conferida para garantir que apenas um produto foi feito com cada conjunto de primers, e que houve amplificação suficiente do produto. Os métodos de análise utilizados para o RT-PCR em tempo real foram os descritos anteriormente (Rossel, J.B., P.B. Walter, et al. (2006), *Plant, Cell and Environment* **29**(2):269-281. Pfaffl, M.W. (2001), "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nuclei Acids Research* **29**(9)).

Para o método Ct comparative, o valor do limiar da reação de amplificação foi ajustado em um ponto onde todas as amostras apresentaram uma taxa exponencial de amplificação. Os valores do limiar do ciclo (Ct) são o número de ciclos feitos para que uma determinada amostra atinja o valor de limiar, no qual a quantidade de fluorescência e, portanto, a quantidade de dsRNA, é a mesma para cada amostra. Esses valores Ct são, então, transferidos para o Excel (Microsoft, EUA). Pontos fora da curva - com valores de Ct divergindo mais do que 0,5 - em cada conjunto de triplicatas, foram descartados. O conjunto de dados resultante foi, então, normalizado por comparação da expressão do gene de interesse, em um dado momento e condições, com a expressão do gene housekeeper no mesmo tempo e nas mesmas condições. Isto foi feito deduzindo-se o valor médio de Ct do housekeeper na amostra do valor de Ct de cada replicata do gene de interesse:

$$\Delta Ct = Ct \text{ (gene de interesse)} - Ct \text{ médio (housekeeper)}$$

Esses valores foram, então, comparados com os da amostra controle, geralmente $t=0$, subtraindo-se o valor do controle do valor de cada amostra, para obter $\Delta\Delta Ct$.

5

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (gene de interesse)} - \Delta Ct \text{ (Controle)}$$

Esses valores foram utilizados para calcular os valores absolutos, usando-se a fórmula:

10

$2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como resultado, o valor do controle torna-se igual a 1 e todas as outras amostras recebem um valor relativo ao do controle.

15

Para o método de quantiicação comparativa, o programa analisa as amostras em relação a um controle definido pelo usuário, geralmente $t=0$. A concentração comparativa é calculada, então, usando a fórmula:

20

Concentração comparativa - amplificação (partida do controle - partida desta amostra)

25

O valor de partida é calculado usando-se a taxa de aumento da fluorescência nos ciclos. A taxa máxima é chamada "taxa no pico" e a taxa de partida é considerada como sendo 80% abaixo daquela. O valor de partida é o número de ciclos ocorridos quando a reação atingiu a taxa de partida.

30

A amplificação é a eficiência média de amplificação para todas as amostras em um conjunto particular de primers. Isto é calculado como a média do aumento da fluorescência durante os quatro ciclos após o ponto de partida.

Idealmente, esse valor será igual a 2 durante a fase exponencial da reação. Uma eficiência média de amplificação e um intervalo de confiança são dados, também, para cada conjunto de primers; intervalo de confiança maior indica maior variabilidade entre as amostras.

Concentrações comparativas derivadas computacionalmente para cada amostra foram, então, exportadas para o Excel e normalizadas contra as do housekeeper. Isto resultou em mudança na expressão como um percentual ou vezes de mudança relativa ao controle. O desvio-padrão de cada conjunto de replicatas também foi calculado usando a função correspondente no Excel. Os resultados foram registrados em um gráfico de coluna no Excel. Quando adequado, foi feita uma média dos resultados para múltiplas replicatas biológicas, e o desvio-padrão entre os experimentos calculados através da função STDEVPA, que mede o desvio-padrão baseado em argumentos dados pela população integral.

Northern Blot

Northern blots foram usados para investigar a extensão em que os genes foram expressos e que variantes ocorreram em conjunto.

Extrações de RNA foram realizadas como acima, usando o kit RNeasy. Apenas três colunas QIAshredder foram utilizadas por replicata biológica e os eluatos reunidos em uma coluna RNeasy para maximizar a concentração do eluato resultante. 20 µg de RNA de cada amostra foram, então, precipitados como acima e ressuspensos em 5 µL de água livre de RNase.

Foi feita eletroforese em gel com o RNA concentrado em condições livres de RNase. Um gel foi preparado fundindo-se 2,25 g de agarose em 125 mL de água tratada com DEPC. A

mistrua foi resfriada antes da adição de 15 mL de MOPS 10X (MOPS 0,4 M, acetato de sódio 0,1 M, EDTA 0,01 M), 7,5 mL de formaldeído e 2 µL de brometo de etidium (EtBr). O gel foi depositado em uma cuba normal de eletroforese antes de ser equilibrado em MOPS 1X adicionado de 1 µL/100 mL de EtBr.

Para cada 20 µg de RNA, foram adicionados 9 µL de formaldeído, 25 µL de formamida e 4,2 µL de MOPS 10X. As amostras foram misturadas em vórtex e aquecidas a 55 °C para desnaturar o RNA. A cada amostra foram adicionados 0,5 µL de EtBr e 2 L de tampão de carregamento (EDTA 1 mM pH 8,0, glicerol 50%, azul de bromofenol 2,5 mg/ml, xilenocianol 2,5 mg/mL) antes da aplicação no gel. Foi feita uma corrida a 100 V por várias horas, até que o corante tivesse se movido 2/3 rds sobre o gel. O RNA foi, então, rapidamente fotografado, sob iluminação UV, para verificar sua qualidade e quantidade.

O RNA foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB) or blotting de gravidade, com 20X SCC, por uma noite. A membrana foi, então, embrulhada e o RNA fixado a ela pó luz UV a 1200V. A membrana foi, em seguida, guardada no escuro até ser usada.

Uma sonda foi preparada por amplificação de SAL1 a partir de cDNA de Col-0 WT usando os primers Fry1-1 F (5'-AACCCATTTTGTAATCTTCC-3')(SEQ ID NO: 42) e Fry1-rt2R (5'-CAGAGAAACAAAGAACGTACGAGA-3')(SEQ ID NO:43) e uma reação de 40 µL. O produto PCR foi corrido em gel e purificado com um kit de extração de gel. A sonda foi, então, marcada com α32P-dCTP radioativo utilizando o Prime-a-gene Labeling System (Promega) conforme as instruções do fabricante. O procedimento foi realizado como descrito em (Rossell J.B., Wilson I.W., and Pogson B.J. (2002), "Global changes in gene

expression in response to high light in *Arabidospis*", *Plant Physiol.* **130**:1109-1120).

Microarranjos

5 RNA para os microarranjos foi extraído como acima,
usando o kit RNeasy. A concentração e pureza do RNA foi
medida usando um espectrofotômetro Nanodrop. A qualidade do
RNA foi avaliada por eletroforese em gel usando 3 µg de RNA.
10 Em resumo, preparou-se um gel a 1% pela fusão de agarose-
1000 de alta qualidade em tampão MOPS 1X. As misturas foram
resfriadas a 55°C antes da adição de formaldeído aquecido,
até a concentração final de 18% (v/v), e vertidas no molde
de gel. Uma vez assentado, o gel foi equilibrado com tampão
de corrida MOPS 1X. O RNA, em 10 µL, foi combinado com 20 µL
15 de tampão de carregamento (52% de formamida, MOPS 1x, 17% de
formaldeído, 7% de glicerol, EtBr 0,02 mg/mL, pitada de azul
de bromofenol), aquecido por 5 min a 70 °C e, em seguida,
resfriado sobre gelo por 2 minutos. As amostras foram
corridas em gel por várias horas, a 90V, até que o corante
20 tivesse se deslocado 2/3 do comprimento do gel.

Quando foi necessário que o RNA estivesse mais
concentrado, o volume foi reduzido em Speedi-Vac, sob calor
médio, por curto espaço de tempo. A qualidade e quantidade
25 do RNA também foram testadas com um RNA 6000 Nano LabChip®
usando o sistema analisador Agilent 2100 Bioanalyser (Santa
Clara, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.
Esse sistema separa as moléculas de RNA com base em seus
tamanhos, por meio de eletroforese em matriz de gel em tubos
30 capilares. Cada amostra e uma ladder são desnaturadas por
calor antes da corrida em tubos diferentes. Um corante
intercalado no gel marca o RNA e a quantidade e peso dele é
lida à medida que ele caminha pelos capilares.

Uma vez confirmada a qualidade do RNA, ele foi preparado para uso com o Affymetrix GeneChip Expression Analysis System (Santa Clara, CA, EUA), utilizando-se os kits e as instruções do fabricante. Em resumo, 5 µg de RNA foram transcritos reversamente usando os primers T7-Oligo(dT) e SuperScript II; esse processo é chamado de síntese da primeira fita, e resultou na ligação do RNA à fita complementar do DNA. Uma segunda fita de cDNA foi, então, sintetizada para substituir o RNA na síntese da segunda fita. Essa síntese utiliza RNase H para remover o RNA antes de reconstruir a segunda fita na forma de DNA, usando T4 DNA polimerase. Os componentes da reação são, então, removidos do cDNA usando-se uma coluna de ligação de cDNA, que foi lavada, seca, e teve o cDNA eluído.

cRNA marcado com biotina foi, então, amplificado a partir do cDNA utilizando-se um processo de transcrição in vitro (IVT), o qual usa mistura de análogo de nucleotídeo biotinilado/ ribonucleotídeo, e T7 RNA polimerase. O cRNA foi, em seguida, purificado por uma coluna, à qual o cRNA fica ligado; pequena alíquota foi passado pelo Bioanalyser a fim de confirmar a qualidade e quantidade do produto. O RNA marcado com biotina também foi quantificado por espectrofotometria nanodrop e sua pureza, confirmada. O rendimento foi ajustado para o RNA não marcado presente, já que todo o RNA foi usado na amostra original. Isto foi feito usando a fórmula:

$$\text{rendimento ajustado de cRNA} = \text{RNAm} - \text{RNAi total}$$

onde RNAm é a quantidade de cRNA medida após a reação IVT e purificação (µg), e RNAi total é a quantidade inicial original de RNA (µg).

20 µg de cRNA foram quebrados em fragmentos de 35-200bp, por hidrólise induzida por Mg^{2+} . Uma pequena alíquota foi analisada no Bioanalyser para confirmar a ocorrência da fragmentação.

5

A fim de confirmar a qualidade do RNA, uma pequena quantidade do cRNA fragmentado, de uma amostra, foi hibridizada a um TestArray3. O processo foi a mesmo usado no ATH1 chips.

10

Para o ATH1 GeneChips, 15 µg de cada amostra de cRNA fragmentado foi hibridizada por uma noite (16 horas), a 45 °C, sob rotação. Os GeneChips foram, então, submetidos a uma lavagem não rigorosa com Fluidics Station 400. Os GeneChips foram, em seguida, corados com estreptavidina ficoeritrina (SAPE), que se liga ao cRNA marcado com biotina. O sinal foi amplificado por adição de um anticorpo primário, que se liga ao SAPE. Um anticorpo secundário biotinilado, que se liga ao anticorpo primário, foi adicionado e, em seguida, o SAPE, que se liga ao anticorpo secundário. O GeneChip foi, então, lavado para remoção do excesso de SAPE e deois escaneado. A ficoeritrina fluoresce a 570 nm, de modo que o GeneChip foi escaneado nesse comprimento de onda. Os resultados foram analisados em seguida.

25

Vários controles foram adicionados ao longo das etapas acima. Durante a síntese da primeira fita, foram acrescentados quatro controles polia RNA para garantir a produção de cRNA marcado. Esses controles foram obtidos de quatro genes de *B. subtilis*, que não estão presentes em células eucariontes. Eles foram adicionados, também, em várias concentrações, para assegurar que o processo fosse efetivo para abundâncias baixa, média e alta dos transcriptos. Na análise final do arranjo, as leituras de

35

intensidade desses genes devem ter uma relação linear com suas concentrações originais.

Um conjunto de controles de hibridização foram adicionados ao cRNA fragmentado antes da hibridização. Novamente, eles possuíam concentrações variadas, para garantir que a relação entre hibridização e intensidade de sinal fosse linear. Três dos controles foram de *E. coli* e um do bacteriófago P1.

Por fim, oligonucleotídeos B2 biotinilados também foram adicionados à mistura de hibridização. Eles fixam-se em torno da parte externa do conjunto, em um arranjo parecido com um tabuleiro de damas, de modo a permitir o alinhamento automático do grid para identificar os conjuntos de sondas.

Análises, incluindo normalização MAS5, análise estatística e razão de correção de falsa descoberta foram feitas, como descrito anteriormente (Rossel et al (2007), *The Plant Cell*, 10.1105/tpc.1106.045898).

Medidas Morfológicas e Fisiológicas

Medidas das Folhas

O potencial hídrico total foi medido usando-se um psicrômetro de termopar especialmente construído (Morgan, (1991), *Australian Journal of Plant Physiology*, **18**, 249-257). Discos das folhas foram colocados em câmaras de equilíbrio por 4 horas, a 22 °C. Uma corrente refrigerante de Peltier foi passada pelo termopar e a força eletromotriz (fem) lida por meio da deflexão de uma agulha em um microvoltímetro (HR 33 Dew Point, Wescor, www.wescor.com/environmental). O potencial hídrico da folha (MPa) foi calculado por interpolação da fem em uma curva padrão. O potencial hídrico do solo foi medido usando-se um

equipamento de placa de pressão (Klute (1986), *Methods of Soil Analysis, Part. 1. Physical and Mineralogical Methods - Agronomy Monograph no. 9* (Klute, A. Ed., Madison, WI, USA: American Society of Agronomy - Soil Science Society of America, pp. 635-662).

Várias medidas fisiológicas foram feitas sobre as amostras de folhas. A espessura e área da superfície das folhas foram registradas. Em experimentos anteriores, o conteúdo relativo de água nas amostras de folhas foi medido registrando-se seu peso fresco, secando-as em saco de papel durante 3 dias a 60 °C e, em seguida, registrando-se seu peso seco. O conteúdo relativo de água (RWC) foi, então, calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$RWC (\%) = (FW - DW) / FW$$

Nos últimos experimentos, os invólucros das folhas de plantas iguais foram excisados, seu peso fresco (Fw) registrado, e incubados em água por, pelo menos 4 horas a 4 °C, no escuro. As folhas foram raspadas e seu peso túrgido (Tw) medido. Finalmente, as folhas foram secas a 80 °C por uma noite e pesadas, a fim de determinar seu peso seco (Dw). O conteúdo hídrico relativo (RWC) foi calculado como (Jones, (2007), *Journal of Experimental Botany*, **58**, 119-130):

$$RWC = \frac{F_w - D_w}{T_w - D_w}$$

Troca Gasosa

Medidas de troca gasosa foram realizadas nas plantas cultivadas com dias de 12 horas para promover crescimento vegetativo e, portanto, folhas maiores. A única exceção

foram aquelas plantas nos experimentos de seca, que foram cultivadas em regime de dias de 16 horas. A troca gasosa foi efetuada com um Li-6400 (Li-Cor, Linclon, NE, EUA) conforme instruções do fabricante. Esse instrumento permite que uma
5 folha presa a uma planta seja introduzida na câmara e uma série de parâmetros medidos. Dentro da câmara, a intensidade luminosa, o espectro da luz, a temperatura, a umidade e a concentração de CO₂ podem ser controlados. Comparando-se a quantidade de CO₂ e de vapor d'água que entram e saem da
10 câmara pode-se inferir a quantidade de fotossíntese e a condutância do estômato. Alterando a intensidade luminosa e a concentração de CO₂ pode-se perceber a resposta do estômato pelo registro da condutância média da folha. A câmara tem 2 cm² de modo que, se a folha de *Arabidopsis* não
15 cobrir inteiramente essa área, a condutância pode ser ajustada para a área da folha no interior da câmara.

Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

O perfil de carotenóides do material foliar foi
20 analisado por HPLC. Em resumo, o material foi triturado em 500 µL de mistura 60/40 (v/v) de acetona/acetato de etila. Esta foi diluída com 400 µL de dH₂O e centrifugada em velocidade máxima, em centrífuga de bancada, por 3 minutos. Os carotenóides foram fracionados e analisados usando um
25 Agilent HPLC com detector de arranjo de diodos, como descrito (Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Bjorkman, O., and DellaPenna, D. (1998), "Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **95**:13324-13329). Os carotenóides
30 foram identificados por comparação de seus espectros e tempos de retenção com padrões, e as áreas dos picos registradas para quantificação pelos coeficientes de extinção molar.

Medidas de Carbono-13

A quantidade de C-13 no tecido foliar dá uma indicação da abertura média dos estômatos ao longo da vida da planta, uma vez que quando o estômato está aberto ele irá favorecer C-12 em relação a C-13. Amostras de folhas foram pesadas, a fim de se obter seu peso fresco, e secas por 3 dias a 60 °C, em saco de papel. As amostras secas foram trituradas em gral, com pilão, e o pó usado para determinar a razão de C-12/C-13 na amostra.

Conteúdo de Clorofila

O conteúdo total de clorofila foi medido por absorbância em 647 nm para clorofila a e 663 nm para clorofila b. Para extrair a clorofila, 10-20 µg de tecido foliar foram triturados em um moinho de esferas com 700 µL de tampão de extração (80% de acetona, tampão de fosfato de sódio 2,5 mM, pH 7,8) no Tissue-Lyser. As amostras foram centrifugadas em velocidade máxima, em centrífuga de bancada, por 5 minutos. A absorção dos extratos foi medida em 647, 663 e 750 nm. A absorbância a 750 nm é a absorbância de referência e, portanto, foi subtraída das absorbâncias em 647 e 663 nm. Para calcular o conteúdo total de clorofila foi usada a seguinte equação:

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/mg FW}) = 17,76 (A_{647} - A_{750}) + 7,34 (A_{663} - A_{750})$$

Conteúdo de Antocianinas

O conteúdo total de antocianinas foi medido por absorbância em 530 nm. Cerca de 30 mg de tecido foram triturados em 300 µL de metanol acidificado (1% de HCl) em Tissue-Lyser, usando um moinho de esferas. Para extrair as antocianinas, 250 µL de clorofórmio e 200 µL de água MilliQ foram adicionados e a mistura colocada em vórtex. Em seguida, o material foi centrifugado em velocidade máxima,

em centrífuga de bancada, por 5 minutos. Foram removidos 200 µL da fase aquosa e a absorbância foi medida em 530 e 657 nm, usando placas de 96 poços em um leitor de placas, ou cubetas individuais. A absorbância devido às antocianinas foi calculada subtraindo-se a devida ao turvamento da amostra (657 nm) da absorbância em 530 nm. A concentração de antocianinas foi calculada pela equação:

$$C = A/\epsilon L \times \text{vol}/1000 \times PM \times 1/\text{peso} \times D \times 106$$

onde C é a concentração (µg/g); A é a absorbância; ϵ é igual a 269000, constante para a antocianina mais abundante, o 3-glicosídeo de cianidina; l é o caminho ao longo da cubeta; vol é o volume total de extrato (mL); PM é igual a 449, o peso molecular do 3-glicosídeo de cianidina; peso é o peso original da amostra (g); e D é o fator de diluição (se cabível).

Ensaio de Ascorbato

Tecido foliar congelado foi ensaiado quanto ao conteúdo de ascorbato e ao índice redox do pool de ascorbato. O tecido foi triturado sob nitrogênio líquido, usando gral e pilão, antes de se transferir cerca de 50 mg do pó para um tubo de eppendorf de 1,5 mL, gelado. Quatro volumes de tampão de extração (ácido metafosfórico 2% (p/v) em água MilliQ; SigmaUltra, Sigma Aldrich, St. Louis, MT, EUA) foram adicionados, e a amostra colocada em vórtex para misturar bem. As amostras foram centrifugadas em velocidade máxima (16,1 sg) em centrífuga de bancada, a 4 °C por 4 minutos. 50 µL do extrato foram, então, adicionados a 485 µL de tampão de ensaio (KH₂PO₄ 67,5 mM, K₂HPO₄ 32,9 mM, EDTA 1,27mM) e fechadas para misturar. O conteúdo de ascorbato reduzido foi, então, medido através das absorbâncias em 265 e 415 nm. O pool de ascorbato foi oxidado por adição de 33,3u de ascorbato oxidase em tampão de ensaio (5 µL a

6,67 U/ μ L , Calzyme Laboratories, San Luis Obispo, CA, EUA) e a absorbância medida. Outra amostra foi reduzida com 5 μ L de ditioreitol 0,2 M em tampão de ensaio por 20 minutos e a absorbância medida. Brancos apropriados foram usados. O volume total de extrato também foi calculado.

Para determinar a quantidade de ascorbato presente, a absorbância a 265 nm foi normalizada contra as absorbâncias de referência e a em 415 nm. Isto dá a concentração de ascorbato, que pode ser, então, usada para calcular o peso fresco (FW) do tecido em mg/100g. A quantidade do pool de ascorbato que foi reduzida pode ser calculada como a concentração original menos a concentração da amostra oxidada. A quantidade total de ascorbato presente pode ser medida como sendo a concentração da amostra reduzida menos a da amostra oxidada.

Ensaio da Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC é uma medida da capacidade antioxidante de uma substância e é largamente empregado para determinar a capacidade antioxidante de alimentos. Para *Arabidopsis*, um extrato do material vegetal foi testado. Este extrato pode estar ligado a membrana -membrana plasmática, tilacóides do cloroplasto, ou outras endomembranas; ou estar solúvel - do citossol, vacúolo, estroma do cloroplasto, etc. O teste mediu a fluorescência de uma molécula fluorescente sensível à oxidação, ficoeritrina (R-PE, Sigam). Um gerador de radicais livres, AAPH (Sapphire BioScience) foi adicionado ao R-PE e, em consequência, a fluorescência decresceu lentamente. O extrato vegetal foi, então, adicionado. A taxa de redução da fluorescência pode, então, ser diminuída ou aumentada, dependendo do extrato ter maior capacidade antioxidante ou oxidante. Como padrão, usa-se um antioxidante, Trolox (Fluka) em lugar do extrato de planta. Trolox é um derivado da vitamina E. A capacidade

antioxidante do extrato pode, então, ser quantificada como equivalente μmol de Trolox/g de peso fresco de tecido, comparando-se as áreas de cada curva.

5 Para preparar o extrato, 20-100 mg de folhas maduras, mas não velhas, foram congeladas em nitrogênio líquido e seu peso fresco determinado em um tubo de Eppendorf pré-pesado. O tecido congelado foi, então, triturado até obtenção de um pó fino, e ressuspensão em 400 μL de água MilliQ estéril. O material insolúvel foi centrifugado em centrífuga de bancada, em velocidade máxima, a 4 °C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido e diluído com PBS (soro tamponado com fosfato; 75 mM, pH 7,0) até uma concentração de 10 mg do peso fresco original/mL. Para o extrato lipossolúvel, o precipitado acima foi lavado duas vezes com dH_2O antes de ser ressuspensão em 400 μL de acetona. As matérias sólidas foram, então, centrifugadas em centrífuga de bancada, a velocidade máxima, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e diluído com PBS até uma concentração de 10 mg do peso fresco original/mL.

25 Para o ensaio propriamente dito, foi usado um espectrofotômetro Eclipse (Cary), capaz de misturar amostras na cubeta, usando uma pequena barra magnética, e medir a fluorescência de quatro amostras por vez. Assim, um branco, um padrão e duas amostras podem ser analisadas simultaneamente. Isto é feito assim:

1. Branco - 2738 μL 3,38 mg/L R-PE + 150 μL 1X PBS + 150 μL 320 mM AAPH
- 30 2. Padrão - 2738 μL 3,38mg/L R-PE + 150 μL 20 μM Trolox + 150 μL 320 mM AAPH
3. Amostra - 2738 μL 3,38mg/L R-PE PBS + 150 μL amostra + 150 μL 320 mM AAPH

Primeiro, a R-PE e amostra/Trolox/PBS são adicionados à cuvetta sob agitação e a fluorescência estabilizada em ~800, por cerca de 20 minutos. A AAPH é, então, adicionada rapidamente a todas as cuvetas e a diminuição da intensidade de fluorescência medida até alcançar o zero. A área sob cada curva é integrada, ajustada pelo fator de diluição e a capacidade antioxidante calculada.

Medidas ABA

O conteúdo ABA em folhas foi medido, usando-se o ensaio Phytodetek baseado em ELISA (Agdia, Elkhart, Indiana, EUA). Para extração de ABA, ~100 mg de tecido foliar foi colhido e, imediatamente, congelado em nitrogênio líquido. O tecido foi triturado, usando o Qiagen TissueLyser e um moinho de esferas, até tornar-se um pó fino. O pó congelado foi suspenso em 1 mL de solução de extração (80% de metanol grau HPLC, 100 mg/L de hidroxitolueno butilado, 500 mg/L de ácido cítrico monohidratado) e, em seguida, girado por 24 horas, no escuro, a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 1000xg por 20 minutos antes que o sobrenadante fosse transferido para um novo tubo. O sobrenadante foi reduzido a ~50 µL no escuro, usando SpeediVac sob calor médio, para remoção do metanol. O líquido restante foi diluído a 1 mL com tampão TBS (3,03 g/L base Tris, 5,84 g/L de cloreto de sódio, 0,2 g/L de cloreto de magnésio hexaidratado, 0,2 g/L de azida de sódio, pH 7,5). Para os ensaios foi usada uma diluição 1:1000 em tampão TBS de cada amostra. O ensaio foi realizado conforme as instruções do fabricante e as placas lidas em 405 nm, com um leitor de placas.

Diversas variações do protocolo de extração foram testadas, incluindo a secagem completa das amostras antes da ressuspensão, filtração e centrifugação do extrato. Também foram feitas tentativas usando 20, 100 e 200 mg de tecido e diluições de 1:10 e 1:100.

Imageamento**Escaneamento por microscopia eletrônica**

Os procedimentos foram realizados com ajuda do Dr. Cheng Huang, ANU Electron Microscopy Unit.

5

10

15

Microscopia eletrônica por escaneamento criogênico was usada para obtenção de imagem da superfície abaxial das folhas. Em resumo, pequenos pedaços de folha madura foram amontoadas com uma mistura de meio de tecido congelado e pasta de carbono, para auxiliar a condutância. As amostras foram, então, congeladas em nitrogênio líquido, sob vácuo, par permitir o congelamento rápido e evitar a formação de cristais de água. Em seguida, as amostras foram aquecidas, sob vácuo a -90 °C para adesão, ou seja, para perderem cristais de água da superfície. A amostra foi, então, novamente resfriada a -160 °C antes de ser recoberta com partículas dce ouro. A imagem da amostra foi realizada em um Cambridge S360 (SEM; 1987; Leica/Cambridge, Wetzlar, Alemanha).

20

25

O mesmo processo foi usado para observar a seção transversal de um botão de flor e folhas maduras. Contudo, essas amostras sofreram fratura ao congelar. Em resumo, uma vez arrumadas e congeladas a vácuo, bateu-se na parte superior das amostras de modo a que elas se partissem e uma seção transversal ficasse exposta.

Microscopia Eletrônica de Transmissão**Fixação das Amostras de Folhas**

30

Pequenos pedaços de folhas maduras foram embebidas em resina para permitir a microscopia eletrônica da seção transversal da folha. Primeiro, as amostras (~3 mm x 3 mm) foram lavadas com tampão de cacolideído 0,1M , 4% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeído, por 2 horas, sob vácuo

fraco. Este foi removido e as amostras lavadas 3 vezes com cacolideído 0,1 M durante 15 minutos. A amostra foi, então, fixada com ácido oácico 0,1 M e tampão de cacolideído 0,05 M durante 90 minutos. As amostras foram lavadas com água, por 3 vezes, durante 15 minutos, e submetidas a um gradiente de etanol, iniciando com 70% e passando para 80%, 90%, 95% e três porções de etanol 100%. Cada lavagem foi feita durante, pelo menos, 15 minutos. As amostras foram depois lavadas com acetona 100% por 15 minutos para retirar o etanol, e expostas a níveis crescentes de resina (aldeído epon) diluída com acetona. A primeira foi 1/3 de resina: 2/3 de acetona, a segunda, ½ de resina: ½ de acetona, e depois, 2/3 de resina: 1/3 de acetona. Cada exposição durou, pelo menos, 30 minutos e o material foi rodado para misturar. As amostras foram, então, expostas a resina pura, por 3 vezes, durante mais de 2 horas para retirar qualquer resto de acetona. As amostras foram, em seguida, colocadas em moldes com resina nova e deixadas por uma noite em forno a 60 °C.

Seccionamento e Coloração

Finas seções do material foliar embebido foram cortadas para MET e microscopia luminosa usando um Ultracuts Ultramicrotome (Reichert, Depew, NY, EUA). Uma faca de vidro foi fabricada para cortar as fatias em água. As seções foram achatadas por aquecimento antes de serem recolhidas em uma grade de suporte. As amostras foram deixadas por uma noite, para secar, antes de serem coradas com acetato de uranila 6% (v/v) em água, por 20 minutos, no escuro. Elas foram depois lavadas com dH₂O, varias vezes, antes de coradas com citrato de chumbo por 10 minutos. O corante foi removido por lavagem com dH₂O antes de seco.

Imageamento

Imagens foram feitas com uma Hitachi h7100FA (125 kV TEM; 1005, Tóquio, Japão) acoplada a uma câmera SIS Megaview

III Widefield CCD (1300 x 1024 pixel; 12 bit; Soft Imaging Systems Corporations, Lakewood, Co, EUA).

Microscopia Luminosa

5 Os procedimentos foram realizados com auxílio da lily Shen, ANU Electron Microscopy Unit.

10 Seções transversais da folha, cortadas com o ultramicrotomo, foram secas sobre lâmina de vidro e cordas com azul de toluidina, antes de serem enxaguadas com dH₂O. imagens da lâmina montada foram feitas por baixo, usando uma Zeiss Axioskip (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha) com uma câmera SPOT CCD (1300 x 1240, 36 bit colour; (Spot Images Corporation, Chantilly, VA, EUA). As imagens foram
15 processadas com o software SPOT Advanced.

Imageamento com Luciferase

20 A atividade de luciferase em plantas transgênicas foi detectada in vivo, usando câmera CCD resfriada. As plantas foram fartamente borrifadas com luciferina 0,5 mM (Biosynth, Suíça), em água contendo gotas de Tween-80 (Laboratory Supply, Austrália) 15 minutos antes e imediatamente antes de serem feitas as imagens. As plantas foram deixadas no escuro por vários minutos, até que a fluorescência da clorofila
25 cessasse, antes de serem feitas as exposições, que variaram de 2 a 10s. Estas foram, então, integradas para aumentar a intensidade das imagens. Uma câmera CCD resfriada (Andor Technology, Japão) foi usada e as imagens processadas com ImagePro® Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, EUA).

30

Extração e Análise dos Metabólitos/Solutos

Cerca de 50 mg (peso fresco) de tecido foliar foram extraídos e analisados por GC-MS, essencialmente como descrito por - Roessner-Tunali et al. (2003), *Plant*

Physiology, **133**:84-99). Em resumo, o tecido foi congelado em N₂ líquido, triturado em moinho de esferas Retsch por 3 min, a 15 oscilações/s. O tecido sob a forma de pó (~50 mg) foi, então, extraído a 70 °C durante 15 min, com 0,5 ml 85% (v/v) MeOH/H₂O contendo 0,2 mg/mL de ribitol com padrão interno. O material insolúvel foi centrifugado a 20.000g por 10 min, para precipitação. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi seca sob vácuo, e o extrato seco derivatizado por metoxiaminação com 20 µL de metoxiamina.HCl em piridina anidra 20 mg/mL (30 °C , 90 min). Para converter os grupos funcionais reativos, contendo hidrogênios reativos a seus derivados com trimetilsilano (TMS) , 30 µL de MSTFA foram adicionados à mistura reacional e deixados reagir por 30 min, a 37 °C . A reação foi deixada equilibrar por, pelo menos, 4 horas antes da análise por GC-MS. Foi injetado 1 µL no GC-MS e um programa de temperatura de 45 min foi usado para separar os analitos; foi usada uma coluna GC 30m Varian Factor Four 5ms com coluna de guarda integrada de 10 m. Dados de Quadrupole-MS foram adquiridos no modo full-scan com uma faixa de varredura de 40 a 600 m/z.

Para análise dos dados usou-se o software livre AMDIS para deconvolução e integração automática dos picos; a comparação dos dados foi feita contra um banco de dados não comercial, de amostras autênticas e índices de retenção. Análise estatística foi realizada usando scripts PHP customizados para processamento automático dos relatórios das bateladas AMDIS e visualização no Excel.

Exemplo 2 - Resultados

Após mutação EMS de sementes de *Arabidopsis thaliana*, vários mutantes com expressão alterada de APX2:LUC foram identificadas, incluindo o mutant *alx8*, que possui expressão de APX2:LUC aumentada. Essas plantas apresentaram maior tolerância à seca - após 9 dias sem água, as folhas de *alx8* permaneceram firmes, verdes e viáveis, enquanto as da planta

nativa tinham se alterado e morrido (ver Figura 7). Encontraram-se níveis ABA mais altos em *alx8* embora, ao mesmo tempo, os componentes nas rotas ABA-dependentes e ABA-independentes estivessem aumentados (Rossel, J.B., P.B. Walter, et al. (2006), *Plant, Cell and Environment* **29**(2):269-281). Por exemplo, os genes de resposta à alta intensidade luminosa, ZAT10 e APX2, são ambos regulados para cima em *alx8*. Contudo, ZAT10 é considerado como pertencente à rota ABA-independente (Zhang, J.Z., et al. (2004), "From Laboratory to Field. Using Information from Arabidopsis to Engineer Salt, Cold and Drought Tolerance in Crops", *Plant Physiol.* **135**(2):615-621), enquanto APX2 é ABA-dependente (Rossel et al, 2006). A regulação para cima dos genes de resposta ao estresse é consistente com os mutantes *fry1* anteriores, embora esses genes não sejam idênticos em cada mutante; por exemplo, RD29A é regulado para mais em *fry1-1* (Xiong, L.M. et al. (2001), "FIERY1 encoding a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis" *Genes & Development* **15**(15):1971-1984), mas não em *alx8* (Rossel et al., 2006). Similarmente, a maior tolerância ao estresse observada em *alx8* é um dado novo. Esse mutante tem também uma morfologia não usual da folha, semelhante a um repolho. Estudos com plantas F1 e F2 mostraram que uma expressão aumentada APX2:LUC e regulação para cima de outros genes de estresse, tolerância à seca e formato alterado de folhas, são co-segregados. Isto é consistente com uma lesão em uma etapa inicial das redes de sinalização de estresse à seca, ou à alta intensidade luminosa, as quais são associadas a apenas um locus genético.

Alx8 é um ponto de mutação em SAL1

O local da mutação pontual de *alx8* foi identificado por clonagem posicional e seqüenciamento. Uma população mapeadora foi criada cruzando-se *alx8*, na família de Col-0, com *Landsberg erecta* nativa. F1 mostrou-se nativa no

fenótipo foliar, no desenvolvimento e na expressão de APX2 (dados não mostrados), confirmando a mutação recessiva. Deixou-se que os indivíduos F1 se auto-fertilizassem e a geração segregadora F2 foi cultivada em canteiro. Indivíduos da geração F2 homozigotos à mutação *alx8* foram identificados pela morfologia foliar, que mostrou-se unida à tolerância à seca e à expressão aumentada de APX2 (Rossel et al., 2006). O primeiro mapeamento de passagem com 22 primers distribuídos entre o genoma *Arabidopsis* foi feito com 400 indivíduos mutantes F2. Isto indicou que a mutação estava ligada à metade inferior do cromossomo 5. Análises mais profundas de ligação com mais marcadores nessa região, levou a uma região de interesse de 617kb. Um mapeamento fino, de aproximadamente 4000 indivíduos F2, foi realizado com dois marcadores flanqueando a região de 617kb, MUB3 e MM19.

Para confirmar a localização da mutação *alx8*, uma cópia nativa do gene e do promotor SAL1 foi usada para complementar o fenótipo mutante. Ambos confirmaram que os indivíduos transformados *alx8* apresentavam morfologia da folha e desenvolvimento do tipo nativo. A progenia de *alx8* complementada uniu-se à do fenótipo mutante de *alx8* e mostrou a morfologia foliar normal, do tipo nativo (ver Figura 2). Isso confirmou que a mutação em SAL1 foi mesmo responsável pelo fenótipo mutante. Plantas nativas também foram transformadas com esse constructo, mas não apresentaram alterações na morfologia foliar, na expressão de APX2 ou no desenvolvimento.

O sequenciamento do gene *alx8* e 2kb do promotor revelaram um único polimorfismo nucleotídico de uma guanina para adenina no 1226º par de bases da sequência genômica At5g63980.1 (sequência TAIR: 4010730406 (17 de abril de 2007), n. de acesso: NM_125794.4; SEQ ID NO:1; Fig. 3). Isso resulta em uma mudança de aminoácido de glicina para ácido aspártico, no aminoácido 217 da sequência codificadora

(acesso TAIR: 4010745380 (16 de agosto de 2007), SEQ ID NO:2; Fig. 4). Essa mutação foi confirmada como sendo a única mutação em SAL1 por sequenciamento do promotor e sequência genômica de várias plantas mutantes. Quatro gerações por retrocruzamento também foram avaliadas quanto à mutação, usando-se marcadores de sequências polimórficas clivadas (dCAPS), para confirmar que o fenótipo foliar foi herdado com a mutação (ver Figura 1A). Ou seja, que nenhuma outra mutação na planta estava causando o fenótipo mutante.

Diversos mutantes em SAL1 foram identificados anteriormente, incluindo a mutação sensível à temperatura, a alta expressão do gene de expressão 2 regulado por estresse osmótico (hos2; Xiong et al., 2004) e os mutantes firey 1 (fry1; Xiong et al. 2001). A mutação fry1-1 resulta em mudança no 341º aminoácido a partir do triptofano para um códon finalizador, resultando em uma proteína truncada, à qual falta um hélice $\alpha 5$, necessária à atividade enzimática (Xiong et al., 2001). Usando um modelo de proteína *in silico* contra a estrutura conhecida do homólogo de levedura, HAL2, a mutação alx8 foi localizada em uma folha. β conservada, interna à proteína. Este domínio não tem função conhecida.

Mutantes Salk_020882

No decurso da genotipagem do mutante alx8, outras genotipagens e fenotipagens de recombinantes permitiram estreitar a área de interesse ao clone BAC MBM17 e sete genes. Várias linhas de inserção de T-DNA foram ordeadas para esses genes, na esperança de fenocopiar o fenótipo alx8. Uma linha, Salk_020882, fenocopiou o fenótipo alx8 com morfologia foliar alterada e desenvolvimento atrasado (ver Fig 10). Essa linha contém uma inserção no gene At5h63980, conhecida como SAL1(FRY1/HOS2). Para confirmar o alelismo, fez-se um cruzamento entre alx8 e SALK_020882. Toda a progenia teve a mesma alteração na morfologia foliar e atraso no desenvolvimento dos dois pais, indicando que os

dois mutantes são alélicos. Plantas SALK_020882 (duas linhagens particulares foram estudadas aqui, referenciadas como salk1 e salk2) também mostraram-se mais tolerantes à seca do que plantas Col-0 nativas (Figuras 12 e 15). Esses mutantes contêm uma linha de inserção de T-DNA no ecotipo Col-0, obtido do Arabidopsis Biological Resource Centre (ABRC). Plantas homozigotas tiveram morfologia foliar semelhante a um repolho, como alx8 (ver Fig. 10), e são resistentes à kanamicina. A mutação é alélica ao alx8 e esses mutantes apresentaram tolerância à seca (ver Figs. 11, 12 e 15). Northern blots indicaram que o mRNA de SAL1 ainda está presente na linhagem SALK_020882, mas múltiplas variantes juntas estão presentes, em comparação com Col-0 nativa e com o mutante alx8, que têm apenas uma.

O sítio de inserção dado por The Arabidopsis Information resource (TAIR) é apresentado na FIG. 9A. Este foi estabelecido por seqüenciamento de passo único a partir do LB do inserto T-DNA. Este forneceu a seqüência complementar, ou seja, na direção da extremidade 5' do gene.

Para confirmar a localização da inserção, foi realizada uma cauda de PCR desde o LB do inserto de DNA de uma planta. Isso resultou no sítio de inserção mostrado na Fig. 9B. A seqüência foi obtida de ambos os lados, indicando a possibilidade de um inserto duplo. A seqüência obtida indicou, também, a exclusão de 11bp em torno do sítio de inserção (ver Fig. 9B, comparada à Fig 9A).

A proteína SAL1 é ausente em alx8 e fry1-1

As proteínas recombinantes para SAL1 nativa e ALX8 mutada foram produzidas por fusões à ubiquitina marcada com poliistidina. Ambas as proteínas DCE fusão foram produzidas com sucesso em *E. coli*, e suas massas calculadas (~52kD) corresponderam aos tamanhos esperados com base na seqüência

de aminoácidos mais a marcação de 14kD (dados não apresentados). Embora várias condições de indução tenham sido tentadas, somente o gene de fusão SAL1 (tipo nativo) foi purificada com sucesso na fração solúvel. Essa proteína também apresentou atividade enzimática PAP fosfatase ($16,6 \pm SE3,65 \mu\text{mol PAP.h}^{-1}.\text{mg}$ de proteína, $n=3$) semelhante à relatada anteriormente (Xiong et al., 2001).

Foi feita análise por western blot para determinar a abundância da proteína SAL1 nas plantas nativa e mutante. Proteína recombinante SAL1 autêntica foi recuperada após clivagem da marcação, fornecendo um polipeptídeo com a massa molecular esperada com base na sequência de aminoácidos (37kD) (Figura 11A, linha 10). Essa proteína foi utilizada para criar anticorpos monoclonais, os quais foram purificados por imunoafinidade contra SAL1. Uma única banda de 37kD, cujo tamanho correspondeu ao da proteína recombinante, foi detectada no extrato de proteínas totais solúveis das duas plantas nativas, mas não nas mutantes (Figura 11A). A proteína SAL1 também não estava presente no extrato de proteínas totais de *alx8*, mas estava no de *Col-0* nativa (Figura 11B).

***Alx8*, *salk_020882* e *fry1-1* são tolerantes a seca**

Fry1-1 é um mutante da linhagem de *Arabidopsis thaliana*, que possui expressão aumentada do gene de resposta ao estresse RD20A sob condições normais e após estresse por frio, salino, osmótico e tratamento com ABA. Isso foi atribuído a uma mutação pontual, resultando em um códon finalizador no sexto exon da proteína SAL1 (At5g63980). Isso resultou em uma proteína truncada, que não possui uma α -hélice conservada contendo um motivo WD-X₁₁-GG, necessário para coordenação de íons metálicos e fosfato, bem como para ativação nucleofílica da água. Em consequência, a proteína não tem atividade contra IP₃ ou PAP. O mutante *fry1-1* foi descrito como tendo maior sensibilidade ao estresse salino,

ou frio e osmótico (Xiong, L.M. et al. (2001), *Genes & Development* **15**(15):1071-1984). Este mutante mostrou, também, alteração da morfologia foliar semelhante à apresentada pelos mutantes *alx8* e *salk_020882*. Nos estudos presentes, plantas *fry1-1* mostraram ser tolerantes à seca, semelhantemente a *alx8* e *Salk_020882*, em comparação com as plantas nativas, quando submetidas a seca em estágios semelhantes de desenvolvimento (ver Fig. 7) ou idade cronológica similar (Fig. 8A). Ver também a Fig. 15A. A Figura 8A mostra que, enquanto Col-0 e C24 nativas exibem folhas cloróticas e murchas após 21 dias de privação de água, as plantas *alx8* e *fry1-1* só mostram sinais de enrugamento após 25 dias; a Figura 15A mostra que *alx8*, *Salk_020882* e *fry1-1* não apresentam sinais de enrugamento ou clorose após 18 dias, enquanto as plantas nativas (Col-0 e Col-24) sim. Como mostrado na Figura 15A, que ilustra os resultados da privação de água após 18 dias, seguida de reidratação por 3 dias, as plantas *alx8*, *Salk_020882* e *fry1-1* recuperaram o vigor em 3 dias, enquanto Col-0 e C24 nativas mostraram pouco, ou nenhum, sinal de recuperação, com folhas desbotadas e murchas. Esse padrão foi reproduzido em mais de 10 experimentos diferentes com, pelo menos, quatro plantas por experimento.

Alx8, salk_020882 e fry1-1 e tolerância seca

Apesar de tanto *alx8* quanto *fry1-1* terem perda de alelos de função (e presumir-se que *Salk_020882* tenha perda de alelo de função), a germinação de *fry1-1* foi descrita anteriormente como sendo sensível à seca (Xiong et al., 2001), enquanto plantas *alx8* maduras cultivadas em canteiro são tolerantes à seca (Rossel et al, 2006), assim como as *Salk_020882*. A descrição de *fry1-1* (por Xiong et al., 2001) baseia-se na crescente eliminação de íons por parte de mudas com 1 semana de idade, mergulhadas em solução contendo PEG. Contudo, não foi observada qualquer diferença na taxa de transpiração de rebentos colhidos de *fry1-1* e C24 nativa,

indicando que não houve alteração no controle dos estômatos. Para investigar a diferença entre fry1-1 e alx8 em relação a este ponto, a transpiração de rebentos colhidos de alx8, fry-1, Col-0 nativa e C24 nativa foi monitorada quanto a
5 perda de água. Não se observou diferença significativa entre os quatro tipos, seja na fase primária ou na secundária, indicando que a perda de água por transpiração e pela cutícula é similar em todas elas.

10 Mutantes fry1-1 foram, então, testados em relação ao solo, com base na tolerância à seca, deixando-se plantas vegetativas maduras sem água por 28 dias. Em experimentos múltiplos, fry1-1 foi mais tolerante à seca do que C24
15 nativa (ver, p/ex. Figuras 7, 8A e 15A). Para garantir que os dois conjuntos de plantas estavam expostos ao mesmo estresse, o conteúdo relativo de água do solo foi aproximado pelo peso do vaso, calculado como percentual do peso original. Não houve diferença significativa no conteúdo de
20 água no solo entre fry1-1 e C24 nativa durante o experimento (Fig. 8B). Isto foi convertido em potencial hídrico do solo e, novamente, não houve diferença significativa.

Semelhantemente, não houve diferença significativa no conteúdo hídrico do solo entre plantas alx8 ou Salk_020882 e
25 Col-0 nativa, em múltiplos experimentos (Figs. 8B, 15B e 21C). Para garantir que a tolerância de alx8 não é fruto apenas de seu desenvolvimento atrasado ou de seu tamanho menor, a tolerância à seca de alx8 foi testada em vários estágios de desenvolvimento. Ela mostrou-se mais tolerante à
30 seca do que Col-0 nativa com 2, 4, 6 e 8 semanas de idade. Ela mostrou-se também mais tolerante à seca do que Col-0 nativa quando ambas tinham 6 folhas; ambas estavam maduras e vegetativas; e quando ambas estavam no mesmo estágio de desenvolvimento, começando a apresentar botões (Figura 21).
35 Quando as plantas estavam começando a florir (Figura 21A), elas tinham basicamente a mesma área e tamanho de florão;

ainda assim, após 9 dias de privação de água, alx8 e Salk_020882 apresentavam-se mais firmes e verdes que a Col-0 nativa, embora os vasos perdessem água a taxas semelhantes (Figura 21C). De modo semelhante, alx8 e fry1-1 no mesmo estágio de desenvolvimento - em que as plantas nativas tinham 8 semanas de idade e alx8 4 semanas - apresentaram maior tolerância à seca (Figura 21B). Perda de água pelos florões colhidos foi medida para quatro genótipos, a fim de determinar se a forma das folhas e dos florões altera a taxa de perda de água, ou se elas regulam diferentemente o fluxo hídrico através do controle dos estômatos (a fase inicial da perda de água), ou da evapo-transpiração cuticular (a segunda fase da perda de água). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as quatro linhagens, em qualquer fase (Figura 21E). Sendo assim, as mudanças na morfologia foliar e a forma dos florões não afeta a taxa de perda de água de plantas colhidas. Por fim, a tolerância à seca foi avaliada para plantas da mesma idade para as quais há uma planta Col-0 por vaso, comparada com duas alx8 por vaso, para compensar a diferença de tamanho das plantas e, novamente, alx8 foi mais tolerante à falta de água do que Col-0. Isto indica que não é o atraso no desenvolvimento de alx8 ou uma diferença no conteúdo hídrico do solo que causa a tolerância de alx8 à seca. Além disso, a transpiração de florões cortados nem sempre correlaciona-se com a tolerância à seca por parte de plantas cultivadas em canteiro.

Para quantificar a extensão da tolerância de alx8 à seca, foi feita uma medida da viabilidade da planta usando fluorescência da clorofila. As plantas alx8 mostraram sobreviver à seca cerca de 40-50% mais tempo do que Col-0 (dados não apresentados).

Em um experimento diferente, o conteúdo relativo de água nas folhas (RWC) foi medido sob condições não-estressantes e após 12 dias de seca (Figura 16A). Como

esperado, o RWC da folha de alx8 não mudou significativamente durante a seca, enquanto o da planta nativa diminuiu consideravelmente. O potencial de água na folha, ou o potencial químico da água dividido pelo volume parcial molar, foi calculado para as mesmas plantas, usando-se um psicrômetro de termopar (Figura 16B). O maior potencial de água das plantas alx8 cultivadas sob seca correlacionou-se com a firmeza mantida, enquanto plantas nativas estressadas pela água tiveram potencial de água nas folhas significativamente menor.

Por fim, a perda de água de florões colhidos foi medida para os mutantes fry1-1 e alx8, e suas respectivas nativas (C24 e Col-0) para determinar se elas regulavam diferentemente o fluxo de água, por meio do controle dos estômatos - a fase inicial de perda de água - ou a evapotranspiração cuticular - a segunda fase da perda de água. Não foi observada diferença significativa em qualquer das fases (dados não mostrados).

A proteína SAL1 é autamente conservada

A proteína SAL1 é altamente conservada em todas as criaturas vivas. Logo, homólogos estão presentes em todas as espécies cultivadas, para as quais se dispõe de substancial informação sobre sequências. Espera-se que SAL1 e seus homólogos estejam presentes em todas as espécies de plantas. Isto está indicado no alinhamento na Figura 5, de proteínas homólogas em plantas que foram sequenciadas. Marcadores de Sequências Expressas (ESTs) de outras espécies de plantas foram pesquisadas para mRNA de SAL1 e várias sequências homólogas foram encontradas (Figuras 6A-6C).

Também há vários genes homólogos de SAL1 no genoma de *Arabidopsis*.

Efeito molecular da mutação de alx8

A expressão de 13 genes de resposta ao estresse foi medida em fry1-1 e alx8. Apenas um número limitado desses genes tem expressão aumentada nos mutantes sob condições normais: COR47 em fry1-1; e APX2, RAP2.6, ZAT10, ZAT12 e DREB2A em alx8. A expressão de RD29A foi aumentada em fry1-1, mas não aumentou em alx8. Os genes de resposta ao estresse HSP70, KIN1, COR15A e ADH não foram substancialmente regulados a maior sob condições normais em fry1-1 (Xiong et al., 2001). Semelhantemente, sHSP, GST6 e APX1 não foram substancialmente regulados para mais em alx8 em condições normais. Isto é surpreendente, dado os níveis constitutivos mais elevados de IP3 nesses mutantes, e indica que a sinalização de IP3 pode estar envolvida em apenas algumas rotas de resposta ao estresse. Para investigar melhor a regulação a maior das rotas de resposta ao estresse, bem como outras rotas relacionadas ao não-estresse, a expressão global foi medida por microarranjos.

Dos cerca de 24.000 produtos gênicos quantificados no ATH1 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA), 1414 genes foram significativamente regulados a maior em mais de 2 vezes no tecido foliar de alx8 em relação à sua expressão em Col-0 nativa. 1033 genes foram regulados para menos em mais de 2 vezes. Em fry1-1, sob condições normais de crescimento, 1099 genes foram significativamente regulados para mais, e 745 para menos, mais de 2 vezes em relação a C24 nativa. Essa tendência à regulação para mais ajusta-se ao papel proposto para SAL1 como regulador negativo de rotas sinalizadoras. A sobreposição entre mudanças de expressão em alx8 e fry1-1 foi, surpreendentemente limitada - dos genes regulados para mais, apenas 727 eram partilhados entre os dois mutantes, e dos regulados para menos, apenas 395. Essas diferenças de regulação não são iguais à diferenças entre C24 e Col-0 nativas. Assim, fica demonstrada a extensão em

que uma mutação semelhante pode causar diferentes padrões de expressão em diferentes ecotipos.

Vários genes de resposta ao estresse foram regulados para mais em *alx8*, incluindo aqueles envolvidos nas rotas dependentes de ABA, por exemplo:

- regulação para mais de tonoplasto aquaporin (TIP5;1), que é, normalmente, regulado para menos por sacarose, sal e H_2O_2 , mas regulado para mais por ABA; e

- o regulador negativo de floração, CONSTANS-LIKE 9 (COL9) foi fortemente regulado para mais em *alx8*. A superexpressão de COL9 resulta na subregulação de CO e FT e retarda a floração, enquanto a queda de T-DNA acelera a floração (Xiao-Fei Cheng, Zeng-Yu Wang (2005), "Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in *Arabidopsis thaliana*" *The Plant Journal* **43**(5):758-768). Esse resultado correlaciona com observações feitas durante essa pesquisa, que mostraram que a floração nos mutantes SAL1 estudados é adiada em quatro a cinco semanas, comparada com as plantas nativas. A Figura 15 mostra *alx8* e as correspondentes plantas nativas Col-0 com 2, 3, 5 e 8 semanas de idade.

Houve expressão aumentada de APX2 (modulação= 9,3; valor $p= 0,003$); ZAT10 (modulação= 5,00; valor $p= 0,028$) e RAP2,6 (modulação = 3,1, mas com desvio padrão grande) em *alx8*. É interessante que a expressão tanto de CCOR47 quanto de RD29A não aumentou significativamente nem em *alx8*, nem em *fry1-1*. A falta de indução de RD29A foi confirmada por RT-PCR em tempo real. Logo, pode haver diferenças no cultivo ou perturbações ambientais durante as manipulações no experimento, que resultem em indução desses dois genes em *fry1-1*. A ausência de qualquer variação nos arranjos para NCED3, GST6, APX1, RD29A e

DREB2A em alx8, sob condições de boa hidratação, também são consistentes com resultados publicados (Rosssel et al., 2006).

Vários genes de resposta ao estresse foram regulados para mais em alx8, incluindo fatores de transcrição como ZAT10, ZAT12, MYC2 e HB6. Outros genes de resposta ao estresse regulados para mais incluem: várias proteínas induzidas por luz precoce, ELIPS; o aquaporin TIP5;1; quinase sinalizadora de estresse SnRK2.2; proteínas induzidas por estresse VSP1 e VSP2; e enzimas antioxidantes CSD1 e CSD2.

A fim de investigar melhor os tipos de rotas que são constitutivamente regulados para mais em alx8, genes cuja expressão foi regulada para maior em mais de 25 vezes foram comparados quanto à suas expressões em outros arranjos depositados em bancos de dados públicos, usando-se Genevestigator. Apesar do crescente conteúdo de ABA em alx8, não houve correlação forte entre os padrões de expressão de alx8 com aqueles em resposta ao ABA. Apenas 10% dos genes foram também regulados para mais por ABA, um número semelhante ao dos que são, normalmente, regulados para menos por ABA.

Também não houve correlação forte com qualquer outro hormônio de crescimento. Houve alguma correlação entre os padrões de expressão de alx8 e a resposta a estresses abióticos como o osmótico, a fermentação, ao calor, oxidativo, ao frio e ao sal, mas não foi forte. Doze por cento dos genes regulados para mais em alx8 eram induzíveis por ABA, mas um número semelhante era regulado para menos por ele. Similarmente, não houve correlação forte com outros tratamentos hormonais, exceto por uma pequena correlação com tratamento por ácido jasmônico.

Efeito de SAL1 em estomato

Anteriormente, alx8 mostrou possuir condutância estomática menor, em relação a Col-0 nativa, para uma gama de intensidades luminosas (Rossel et al., 2006). Esse decréscimo
5 poderia ser causado por diversos fatores, inclusive mudanças no perfil morfológico, fisiológico e molécula da planta.

A condutância reduzida poderia ser devida a alterações de densidade, tamanho e/ou morfologia do estômato de alx8. Logo,
10 microscopia eletrônica de varredura criogênica (SEM) foi feita para observar os estômatos. Estes tinham aparência normal e não formavam clusters como em outros mutantes com mutações no desenvolvimento dos estômatos. Eles também não estavam localizados em uma reentrância, o que poderia diminuir a
15 condutância devido ao aumento da resistência causado pelo efeito da camada limite. Os estômatos de alx8 eram, também, de tamanho semelhante aos de Col-0 nativo. Usando SEM, a densidade dos estômatos da superfície abaxial das folhas foi calculada, e encontrada ligeiramente maior em alx8 do que nas
20 plantas Col-0 nativas. Este é um aumento muito menor em comparação com mutantes de densidade estomática e distribuição 1 (ssd1; AT1G04110), que possuem densidade estomática 2,5 vezes maior no lado abaxial (Schlüter et al., 2003). Além disso, houve também um aumento no número de células
25 epidérmicas, resultando em um índice estomático semelhante em alx8 e na Col-0 nativa. Isto foi confirmado pela casca epidérmica de estômatos em plantas alx8 e Col-0 nativa, cultivadas em experimentos diferentes. Dessa vez não houve diferença significativa de densidade estomática entre alx8 e
30 Col-0 nativa. Novamente, o índice estomático foi comparável nas duas plantas. Isso enfatiza a importância do índice estomático como medida do número de estomas ao comparar tecidos de plantas como desenvolvimento alterado. Apesar das folhas terem idades semelhantes, elas podem diferir em seus
35 estágios de expansão, resultando em maior densidade celular. Se o número de estômatos fosse um fator de tolerância à seca

em alx8, seria de se esperar que esta teria um índice estomático menor do que Col-0 nativa. Este não é o caso e, portanto, deve haver uma alteração na função dos estômatos.

5 A condutância também pode ser reduzida por uma diminuição da abertura dos estômatos. Discriminação de C-13 foi usada para verificar se havia uma diferença na abertura estomática média ao longo da vida da planta. Quando os estômatos estão abertos e gases são livremente trocados com o exterior, a
10 planta irá preferir fixar $^{12}\text{CO}_2$ ao invés de $^{13}\text{CO}_2$ devido à discriminação por RUBISCO. Mas quando os estômatos estão fechados, o acesso aos gases é limitado e a planta é forçada a usar $^{13}\text{CO}_2$. Assim, a razão de ^{13}C para ^{12}C na planta pode ser usada para indicar a condutância estomática média da planta.
15 Em condições normais de crescimento, observou-se que não há diferença na discriminação em $^{13}\text{CO}_2$ entre nativa e alx8. Isso indica que a abertura média dos estômatos é comparável nas duas plantas em condições normais de crescimento, o que foi confirmado por medida de abertura média de estômatos usando-se
20 casca epidérmica de folhas em um período de nove horas. Novamente, não houve diferença significativa na abertura observada para alx8 e Col-0 nativa durante esse período.

Para verificar se houve diferença significativa na
25 abertura dos estômatos como resposta à seca, foi feita discriminação de $^{13}\text{CO}_2$ em plantas que haviam estado sob seca durante 20 dias. Apenas tecidos desenvolvidos durante o período de seca foram colhidos. O $\delta^{13}\text{C}$ das plantas afetadas pela seca foi maior do que o das plantas controle, tanto para
30 Col-0 nativa quanto para alx8, indicando que a abertura dos estômatos havia sido reduzida. Mas o $\delta^{13}\text{C}$ de alx8 afetada pela seca não foi maior do que o de Col-0 nativa afetada pela seca, indicando que aquela planta não teve uma abertura estomática menor durante o período de seca. Logo, parece que a menor
35 condutância observada para alx8 deve-se a fatores diferentes da abertura estomática.

Morfologia foliar

É bem conhecido que mudanças morfológicas como suculência e mais pelos nas folhas podem alterar a tolerância à seca. A morfologia foliar de alx8 é consideravelmente alterada em
 5 relação à de plantas Col-0 nativas. Suas folhas são menores e mais arredondadas, com bordas mais lobuladas. A superfície das folhas é, frequentemente, rugosa e o tamanho do pecíolo, menor, dando ao invólucro uma aparência semelhante a uma alface. O mutante SALK_020882 apresenta morfologia foliar
 10 similar (ver, p/ex., Figura 12), assim como o mutante fry1-1 (ver, p/ex., Figuras 7 e 8A). Maior rugosidade da superfície da folha pode aumentar o efeito da camada limite, diminuindo a transpiração.

15 A espessura da folha foi medida e encontrou-se que ela é significativamente maior em alx8 do que em plantas Col-0 nativas (Figuras 18A e B). Essa espessura significa que vapor d'água tem que percorrer uma distância maior até a abertura estomática, e pode inibir a perda de água pela folha.
 20 Espessura foliar aumentada resulta, também, em menor razão entre área de superfície e volume, o que pode reduzir a perda de água pela cutícula. Seções transversais das folhas examinadas por micfoscopia luminosa também indicaram diversas alterações na estrutura interna da folha, incluindo um feixe
 25 vascular desorganizado, formato célula alterado e cloroplastos menores em alx8 (Fig. 18B). A cutícula é outra possível fonte de perda de água pelas folhas. Mas não há diferença visível na espessura ou na estrutura da cutícula em alx8, comparada com Col-0 nativa. Além disso, não há alteração significativa na
 30 regulação dos genes sintetizadores de cutículas, como WAX2 (At5g57800), CUT1/CER6 (At1g68530) e ER1 (At1g02205) em alx8, em relação a Col-0 nativa.

35 Apesar de atraso no desenvolvimento e de parecer menor devido a mudanças nas folhas e na forma do invólucro, as plantas alx8 acumularam massas fresca e seca do invólucro

semelhantes às da planta nativa na oitava semana de crescimento (dados não apresentados).

Morfologia celular e potencial osmótico

5 Os cloroplastos de Col-0 nativa e de alx8 foram examinados mais cuidadosamente através de microscopia eletrônica de transmissão; os cloroplastos de alx8 apresentaram falta de grãos de amido. Essa inibição no acúmulo de amido foi confirmada em alx8, e também em fry1-1, por
10 incorporação de iodo (figura 19). Tipicamente, plantas acumulam amido transitoriamente em suas folhas durante o dia, e o degradam à noite. Como esperado, as folhas nativas mostraram um aumento de amido à noite, em comparação com a manhã. Semelhantemente, folhas de alx8 e fry1-1 acumularam
15 mais amido à noite do que pela manhã. Contudo, a quantidade presente foi substancialmente menor do que nas plantas nativas sob boas condições de hidratação.

Esse decréscimo em amido correlaciona-se com um aumento
20 na expressão de β -amilases, BMY1 e BMY8, em alx8. Essas enzimas hidrolisam o amido transitório fornecendo maltose e α -dextrina limite, o que pode aumentar o potencial osmótico intracelular das células da planta. O perfil metabólico de alx8, fry1-1 e seus correspondentes nativos, sob boas
25 condições de hidratação, foi analisado por GC-MS.

As quatro linhagens possuem diferentes perfis, como indicados pela análise de componentes principais (PCA), com alguma sobreposição entre C24 e Col-0 (Figura 20). Ambos os
30 mutantes foram claramente separados de suas correspondentes nativas pelo primeiro componente principal (PC1; respondendo por 47,2 da variância total), representado a maior classe de separação observável por PCA. É interessante que alx8 e fry1-1 foram claramente separados pelo segundo component principal
35 (PC2; respondendo por 25,1% da variância total), enquanto as duas nativas não o foram. Nos mutantes SAL1 houve aumentos

significativos nos níveis de poliamina e putrescina em alx8 e fry1-1 (Tabela 2). Isso correlaciona-se com uma aumento na expressão do gene limitador da taxa de biossíntese de poliamina, arginina carboxilase, ADCZ (6,43 vezes) e um
5 decréscimo na expressão da enzima que converte espermidina em espermina, ACL5 (-3,90 vezes). Não houve diferença significativa na abundância de prolina em alx8, relativamente a Col-0, apesar do aumento do gene de biossíntese de prolina, pirrolina-5-carboxilato redutase (3,61 vezes). Tanto em alx8
10 como em fry1-1 houve mudanças na abundância de grande número de açúcares, incluindo níveis fortemente menores de frutose, galactose, glicose, celobiose e muitos açúcares desconhecidos e derivados de açúcares. Houve também um dramático acúmulo de vários açúcares desconhecidos e derivados de açúcares que
15 estavam em níveis indetectáveis, ou perto disso, nas plantas nativas (Tabela 2). Foi igualmente surpreendente observar que houve fortes decréscimos nos ácidos orgânicos citrato, isocitrato, fumarato e malato, além de forte aumento de diversos metabólitos de classes desconhecidas, alguns deles
20 com homologia espectral com compostos relacionados ao indol (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfis metabólicos característicos de mutantes

Classe do Metabólito	Nome do Metabólito	<i>alx8</i> vs Col-0		<i>fry1-1</i> vs C24	
		N. de diferenças	Valor de p	N. de diferenças	Valor de p
Ácidos Orgânicos	Citrato	<0,01	<0,001	0,09	0,009
	Fumarato	0,03	0,003	0,08	0,001
	Isocitrato	0,05	0,014	0,03	0,004
	Malato	0,08	<0,001	0,21	0,021
Pollaminas	Putrescina	15,2	0,008	5,23	0,001
Carboidratos	[Dissacarídeo Desconhecido] RI=2869	0,01	<0,001	0,01	<0,001
	Glicose	0,03	<0,001	0,09	<0,001
	[Dissacarídeo Desconhecido] RI=1946,9	0,04	0,001	0,11	<0,001
	[Açúcar Desconhecido] RI=2116,9	0,05	<0,001	0,19	0,001
	[Açúcar Desconhecido] RI=2122,6	0,05	<0,001	0,16	0,001
	Celobiose	0,06	0,047	0,06	0,007
	Galactose	0,11	0,001	0,09	<0,001
	Frutose	0,16	<0,001	0,29	0,002
	[Dissacarídeo Desconhecido] RI=2730,9	0,16	0,044	0,3	0,035
	[Monossacarídeo Desconhecido] RI=1777,7	0,32	0,002	0,14	0,001
	[Desconhecido, Semelhante a Galactinol] RI=2963	0,41	0,007	0,07	0,003
	[Açúcar Desconhecido] RI=2094,1	0,45	0,012	0,66	0,041
	[Desconhecido, Dissacarídeo Presumido] RI=2836,1	0,45	0,009	0,22	<0,001
	[Dissacarídeo Desconhecido] RI=2534,4	5,63	<0,001	5,97	0,001
	[Dissacarídeo Desconhecido] RI=2544,4	13,92	<0,001	5,39	0,002
	[Desconhecido, Dissacarídeo Presumido] RI=2808,4	50,86	<0,001	22,62	0,002
	[Desconhecido, Dissacarídeo Presumido] RI=2923,4	75,11	0,001	26,13	0,018
	[Desconhecido, Dissacarídeo Presumido] RI=2898,4	155,75	<0,001	227,13	0,001
	[Açúcar Desconhecido] RI=2149,9	168,5	<0,001	60,67	0,001
	[Desconhecido, Provável Dissacarídeo] RI=2748,9	313,1	<0,001	136,59	<0,001
	[Desconhecido, Dissacarídeo Presumido] RI=2997,5	2767,48	<0,001	5684,57	<0,001
	[Desconhecido, Dissacarídeo Presumido] RI=2915,4	4624,26	<0,001	456,97	0,001
Classe Desconhecida	[Desconhecido] RI=2656,2	13,33	<0,001	34,94	0,026
	[Desconhecido] RI=3116,0	778,55	<0,001	92,18	<0,001
	[Desconhecido] RI=2656,2	1027,05	<0,001	1100,47	0,006
	[Desconhecido, Possivelmente Relacionado a Indol] RI=1404,6	99,82	0,002	26,54	0,005
	[Desconhecido, Possivelmente Relacionado a Triptamina] RI=1505,1	16,38	0,003	32,48	0,001
	[Desconhecido, Possivelmente Relacionado a Indol] RI=1389,1	200,04	<0,001	104,69	0,002

5 Números de diferenças (modulações) e valores p (n=5) são apresentados para as maiores (mais intensas) diferenças entre metabólitos comuns a *alx8* e *fry1-1*. Metabólitos desconhecidos (entre colchetes) foram registrados com base na similaridade de seus espectros de massas, com relação aos espectros de referência na biblioteca de espectros de massas

do NIST05. Índices de retenção são dados para os metabólitos desconhecidos. RI= índice de retenção.

Discussões

5 A tolerância à seca dos mutantes alx8 parece ser devida
à redução na transpiração sob condições estressantes, que
resulta em maior conteúdo relativo de água nas suas folhas e
no solo. Contudo, essa menor transpiração não parece
decorrer de aumento na abertura estomática induzida pela
10 seca. Tanto os experimentos de discriminação de carbono
quanto os de desidratação de florão colhido indicaram menor
abertura dos estômatos de alx8 em comparação com os de Col-0
nativa, sob seca. Logo, a menor perda de água deve-se a
outras alterações morfológicas, fisiológicas ou moleculares,
15 ou combinações delas, em alx8.

Mudanças na morfologia estrutural de alx8 poderiam
causar a redução na perda de água em condições de seca.
Maior espessura das folhas e feixe vascular desorganizado
20 podem tornar mais lentos a movimentação da água através da
planta e a difusão do vapor d'água através das câmaras
subestomáticas. Similarmente, pode haver alterações na
morfologia das raízes de alx8, que alterem a retenção e a
translocação de água sob condições de estresse hídrico.

25 Apesar da falta de indução de genes de resposta ao
estresse conhecidos, ainda há várias alterações no perfil
metabólico de alx8 relacionadas às respostas ao estresse,
incluindo aumento nas poliaminas, trealose, açúcares e
30 glicerol.

O acúmulo de osmoprotetores em alx8 e fry1-1 parece ser
um fator que contribui para suas tolerâncias à seca. O nível
da poliamina putrescina foi 15,2 vezes maior

(valor $p = 0,008$) em alx8 do que em sua correspondente nativa, Col-0. Correspondentemente, alx8 possui expressão mais alta da enzima biossintética de poliaminas ADC2, que é, normalmente, superregulada em resposta ao estresse osmótico (Perez-Amador, M.A. et al (2002), *Plant Physiology*, **130**, 1454-1463). Sob o aspecto constitutivo, altos níveis de putrescina foram relatados em variedades de trigo tolerantes à seca e em variedades tolerantes ao estresse oxidativo da erva daninha *Conyza bonariensis* (Ye et al., (1997), *Plant Physiology*, **15**, 1443-1451). Já foi demonstrado que níveis maiores de poliamina devido à superexpressão de enzimas biossintéticas induzem tolerância a diversos estresses abióticos, incluindo seca (Kurepa et al., (1998), *Plant Cell Physiology* **39**, 987-992; Kasukabe et al., (2004) *Plant and Cell Physiology* **45**, 712-722). Embora o papel exato da putrescina na tolerância permaneça incerto, possibilidades foram descritas, como a defesa direta ou indireta contra a oxidação (Ye et al., 1997) e a ação reguladora da síntese de espermina e espermidina durante a seca, que tem um efeito anti-envelhecimento em toda a planta, resultando em espécimens fenotipicamente normais (Capell et al., (2004), *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **101**, 9909-9914).

Os níveis de diversos açúcares também foram alterados no tecido foliar de alx8, incluindo grande aumento no número de açúcares não identificados (Tabela 2). Essas alterações correlacionam-se, inversamente, com o menor acúmulo de amido transitório nos cloroplastos de alx8 (Figura 19). Os açúcares podem ter um papel importante na resposta ao estresse osmótico, como osmoprotetores, protegendo macromoléculas e evitando fusão da membrana (Bartels and Sunkar (2005), *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 23-58). Assim, a composição alterada de açúcares no tecido foliar de alx8 pode estar envolvida em sua tolerância à seca.

A pré-aclimação às condições de seca e o desenvolvimento alterado de *alx8* não afetam o balanço hídrico da planta em condições de abundância de água. Mas, pode explicar o crescimento temporariamente retardado de *alx8*, já que recursos são alocados para mecanismos de tolerância ao estresse e não para o crescimento. Esse efeito é temporário, já que em estágios mais avançados do desenvolvimento, os pesos secos dos florões de *alx8* e de *fry1-1* são semelhantes aos de suas correspondentes nativas.

As diferenças observadas nos metabólitos dos mutantes *alx8* e *fry1-1* já estão presentes nas condições normais de crescimento, indicando uma pré-aclimação à seca. Esta não afeta o balanço hídrico das plantas sob condições de abundância de água. Não se observaram diferenças no potencial hídrico nem no conteúdo relativo de água das folhas. Também há semelhanças entre as aberturas dos estômatos de *alx8* e *Col-0* nativa sob essas condições, como ficou demonstrado pela discriminação do carbono e pelas cascas epidérmicas das folhas.

Uma vez que as taxas fotosintéticas de *alx8* e *Col-0* nativa são semelhantes nessas condições, o atraso no desenvolvimento de *alx8* deve-se, provavelmente, mais à reprogramação dos recursos e ativação das rotas supressivas de crescimento, do que à perda de recursos.

Mutações relacionadas a perdas funcionais em *SAL1* resultaram em superregulação de >1000 genes e subregulação de 500-1000 genes sob condições não estressantes de crescimento, em comparação com as plantas nativas. O papel de *SAL1* como regulador da expressão gênica no estresse e no desenvolvimento é reforçado pela sua função negativa no gene silenciador pós-transcricional (Gy et al. (2007), *Plant Cell*, tpc. 107.055319) e pelas alterações na morfologia e no

tempo de floração dos mutantes SAL1. Na verdade, apenas 7,6% dos 2447 genes regulados diferentemente em *alx8* são classificados como de resposta ao estresse (dados não apresentados) e a maioria deles não é indutível por ABA, sugerindo que nem todas as rotas de resposta ao estresse estão constitutivamente ativadas em *alx8* sob condições não estressantes de crescimento. Por exemplo, APX2, RAP2.6, SHSP e DREB2A são induzidas entre 2- e 20 vezes em folhas não estressadas; mas estresse por alta luminosidade (HL) resulta em indução de 25- a 700 vezes nos mesmos genes, demonstrando que outras rotas reguladoras deles são indutíveis por estresse (Rossel et al., 2006). E mais, a expressão de RD22, que responde à desidratação, é superregulada por ABA (Yamaguchi-Shinozaki et al. (1992), *Plant and Cell Physiology* **33**, 217-224) e sua indução é, em parte, dependente do fator de transcrição MYC2 que, quando superexpresso, resulta em indução constitutiva de RD22 (Abe et al., (1997), *Plant Cell* **9**, 1859-1868; Abe et al., (2003), *Plant Cell* **15**, 63-78). Contudo, em *alx8*, a despeito de um aumento de 8,2 vezes na expressão de MYC2, a expressão de RD22 é subregulada 3,7 vezes. De modo semelhante, não há indução significativa de ADH1 ou de KIN2/COR6.6, que mostraram responder a ABA e serem reguladas por MYC2 (Abe et al., 2003). Isso indica a necessidade de interação de múltiplas rotas, além daquelas independentes de ABA constitutivamente ativadas em *alx8* e *fry1*, para ativação completa da resposta ao estresse.

Dos fatores de transcrição que respondem ao estresse, conhecidos, um pequeno grupo é superregulado significativamente em *alx8* sob condições não estressantes, incluindo dois fatores de transcrição do tipo dedo de zinco, ZAT10 e ZAT12. Ambos estão envolvidos nas rotas de resposta a estresse abiótico, como seca e alta luminosidade (Sakamoto et al., (2004), *Plant Physiology*, **136**, 2734-2746; Davletova et al., (2005), *Plant Physiology*, **139**, 847-856; Rossel et al., (2007), *The Plant Cell*, 10.1105/tpc.1106.045898). A

superexpressão de ZAT10 induz a expressão de APX2 e de 18% dos genes regulados para mais em HL (Rossel et al., 2007). Em correspondência, 24,6% dos genes superregulados pó HL também são regulados para mais em alx8, enfatizando ainda mais a sobreposição entre as redes de resposta à seca e à HL. Altos níveis de expressão de SAL1 no tecido vascular (Xiong et al., 2001) sugerem um papel na transdução de sinais durante o estresse por seca. Essa localização correlaciona-se com a maior produção de H₂O₂ e aumento da expressão da enzima antioxidante na bainha parenquimática, que se observa como resposta a outros estresses abióticos, como HL (Karpinski et al., (1999), *Science*, **284**, 654-657; Rossel et al., 2007). Além disso, a expressão de APX2 e ZAT10 é grandemente localizada nos vasos, o que pode indicar um papel de SAL1 no controle de respostas mediadas por ROS semelhantes.

A seca induz um aumento em ABA e, tipicamente, há um aumento correspondente na expressão das enzimas biossintéticas de ABA de taxa limitada, NCED3 e NCED1 (Iuchi et al., (2001), *Plant Journal*, **27**, 325-333). Contudo, esses genes não são regulados para mais em alx8, nem há regulação para menos dos genes envolvidos no catabolismo de ABA; na verdade, a enzima catabólica CYP707A1-4 é superregulada (dados não mostrados). Logo, o aumento no conteúdo de ABA em alx8 (Rossel et al., 2006) não parece ser regulado transcripcionalmente.

A maioria dos genes regulados para mais (66%) e para menos (53%) em fry1-1 foram co-expressos em alx8, comparado com o tipo nativo. Contudo, houve diferenças entre as expressões gênicas e os perfis metabólicos de alx8 e fry1-1, o que é interessante, dado que ambas são mutações do tipo de perda funcional no mesmo gene. C24 e Col-0 têm perfis metabólicos singulares, embora semelhantes e, portanto, é

possível que diferenças no ecotipo alterem sutilmente o papel de SAL1 e os efeitos de sua perda em cada ecotipo.

Outra observação interessante durante essa pesquisa foi a de que os mutantes SAL1 estudados apresentaram floração retardada em relação às plantas nativas, e que tal correlacionava-se com uma forte superregulação do regulador negativo de floração CONSTANS-LIKE 9 (COL9). Isto pode ter aplicação em vários aspectos da agricultura, incluindo o atraso de floração (e, portanto, tipicamente, senescência) de espécies usadas para forragem, produzindo plantas com períodos de crescimento mais longos, o que pode levar a rendimentos ou partes maiores (como flores, caules, folhas, tubérculos, etc.). O aumento da expressão de SAL1 pode ter um efeito contrário nas plantas.

Conclusão

Mutantes SAL1 sobrevivem de 40-50% mais tempo a secas prolongadas, em comparação com as plantas nativas, e embora o desenvolvimento seja alterado, a biomassa de folhas e caules em plantas totalmente maduras permanece inalterada. Sem querermos nos prender à teoria, supomos que a proteína SAL1 exerce um papel na regulação negativa das rotas que controlam as alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares, cuja ativação resulta em maior indução das redes de estresse. O resultado é uma maior tolerância à seca ao invés de uma resposta de minimização. Isso é indicado por um grau de pré-aclimatação, como a sobrerregulação constitutiva dos genes de resposta ao estresse, por exemplo, do antioxidante APX2, acúmulo de osmoprotetores, como as poliaminas e açúcares, e acúmulo de ácido abscísico sob condições não estressantes. Logo, parece que SAL1 regula negativamente a tolerância à seca e, em consequência, os mutantes mantêm o viço e o potencial hídrico intacto sob estresse por água.

Deverá ser observado que, embora modalidades específicas da invenção tenham sido aqui descritas com o propósito de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem se desviar do espírito e do escopo desta invenção, como definidos nas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de uma planta com maior resistência ao estresse, em relação à planta nativa, caracterizado por:

5

(a) Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, resultando em menor atividade associada com SAL 1, ou homólogo seu, na(s) referida(s) célula(s);

10 (b) Regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); e

(c) Seleção de uma ou mais plantas que sejam mais resistentes ao estresse do que a planta nativa.

15 2. O método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das referidas mutações é introduzida por exposição da(s) referida(s) célula(s) a mutagênicos químicos ou físicos ou por métodos de mutação insercional, como transposons ou T-DNA.

20

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das referidas mutações é introduzida por método recombinante.

25

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de introduzir pelo menos uma mutação no gene SAL 1, ou homólogo dele, ou inibir ou suprimir a expressão do gene SAL1 ou de homólogo dele.

30

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de introduzir uma mutação na sequência nucleotídica codificadora de SAL1, ou de homólogo dele, na(s) referida(s) célula(s).

35

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreender a inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos na região dos nucleotídeos 731 a 745, 1226, 1518, 1519 e 1690 da SEQ ID No. 1, ou de posição equivalente, em um homólogo, de pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No. 1.

8. Método de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inclusão de uma mudança de guanina para adenina na posição 1226 da SEQ ID No. 1, ou em posição equivalente, em um homólogo, de pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No. 1.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido, de glicina para ácido aspártico, na posição 217 da SEQ ID No. 2.

10. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inserção de um mais nucleotídeos entre as posições 734 e 735 da SEQ ID No. 1 ou em posição equivalente, em um homólogo, de pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

11. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a substituição dos nucleotídeos 735-745 da SEQ ID No.1, ou nucleotídeos equivalentes, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1, por um ou mais nucleotídeos.

12. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inserção de um ou mais nucleotídeos entre, ou incluindo, as posições 1518 e 1519 da SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que o(s) dito(s) nucleotídeo(s) inserido(s) ou substituído(s) incluem uma inserção de T-DNA.

5 14. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inclusão de uma mutação de citosina em timina na posição 731 da SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

10

15. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a mudança de guanina por adenina na posição 736 de SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os

15 nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

20

16. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a mudança de guanina em adenina na posição 1690 de SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

25

17. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação é uma mutação nula SAL1.

30

18. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender a introdução na(s) referida(s) célula(s), de ácido nucléico exógeno que suprime a expressão da proteína endógena SAL1, ou de homóloga dela.

35

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido ácido nucléico exógeno possui uma sequência de ácidos nucléicos homóloga ou complementar a, pelo menos, uma porção da sequência codificadora de SAL1 endógena, ou de homólogo dela.

20. Método de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o referido ácido nucléico

exógeno está ligado operacionalmente a promotor indutível de estresse.

21. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender a introdução na(s) referida(s) célula(s) de ácido nucléico exógeno que substitui a expressão da proteína SAL1 endógena, ou de homólogo dela, pela expressão de uma proteína exógena.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a planta resultante é mais resistente ao estresse por seca, salinidade, temperatura ou luminosidade, ou combinações deles, do que a planta nativa.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a planta resultante é mais resistente à seca do que planta nativa.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 23, caracterizado pelo fato de a referida planta foi selecionada entre Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae/Amaranthaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Gramineae, Leguminosae, Poaceae, Rosaceae ou Solanaceae.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida planta é membro da família Brassicaceae.

26. Uma planta mais resistente ao estresse do que a planta nativa, caracterizada pelo fato de ser obtida por qualquer método das reivindicações de 1 a 25.

27. A planta de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de ser mais resistente ao estresse por seca, salinidade, temperatura ou luminosidade, ou qualquer combinação deles, do que a planta nativa.

28. A planta de acordo com a reivindicação 27 caracterizada por ser mais resistente, pelo menos, à seca do que a planta nativa.

5 29. A planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizada pelo fato de que a referida planta foi selecionada entre as famílias Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae/Amaranthaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Gramineae, Leguminosae, Poaceae, 10 Rosaceae ou Solanaceae.

15 30. A planta de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a referida planta é membro da família Brassicaceae.

31. Método de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que a planta resultante tem florescimento tardio.

20 32. Método para obter uma planta com tempo de florescimento alterado em relação à planta nativa caracterizado por compreender:

25 (a) introdução de pelo menos uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, que resulte em alteração da atividade associada a SAL1, ou homóloga dele, na(s) referida(s) célula(s);

(b) regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); e

30 (c) seleção de uma ou mais plantas que tiveram florescimento alterado em relação à planta nativa.

33. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a mutação ou ácido nucléico exógeno referido resulta em menor atividade associada a SAL1, ou homólogo dele, 35 e de que o referido método resulta em uma planta com tempo de florescimento tardio.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado pelo fato de que o referido atraso no florescimento pode ser de cerca de sete a cerca de cem dias.

5 35. Uma planta com tempo de florescimento alterado em relação à planta nativa, caracterizada pelo fato de ter sido obtida por qualquer um dos métodos das reivindicações 31 a 34.

10 36. Uma planta com atraso no tempo de florescimento em relação à planta nativa, caracterizada pelo fato de ter sido obtida por qualquer um dos métodos das reivindicações 31 a 34.

15 37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de as plantas resultantes possuírem fenótipos foliares alterados.

38. Método para obter uma planta com fenótipo foliar alterado em relação à planta nativa caracterizado por compreender:

20 (a) introdução de pelo menos uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, que resulte em menor atividade associada a SAL1, ou homóloga dele, na(s) referida(s) célula(s).

5 (b) regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); e

(c) seleção de uma ou mais plantas com fenótipo foliar alterado em relação à planta nativa.

30 39. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38 caracterizado pelo fato de o referido fenótipo foliar alterado compreende uma folha mais espessa, mais curta, mais arredondada, com extremidades mais lobuladas, ou uma folha com duas ou mais alterações fenotípicas, sendo estas selecionadas entre folhas mais espessas, mais curtas, mais arredondadas e
35 extremidades lobuladas.

40. Uma planta com fenótipo da folha alterado em relação à planta nativa, caracterizada pelo fato de ter sido obtida por qualquer um dos métodos das reivindicações de 37 a 39.

5 41. Parte de planta ou semente mutante ou transgênica, caracterizadas por serem oriundas de uma planta de qualquer uma das reivindicações 26 a 30, 36 ou 40.

10 42. Método para investigar uma planta quanto à presença de pelo menos um alelo mutante de uma sequência de de nucleotídeo codificando SAL1 ou homólogo dele, caracterizado pelo fato de dito método compreender a análise de DNA da planta usando pelo menos uma molécula adequada de ácido nucléico como sonda ou primer que é capaz de hibridizar-se a um gene SAL1, ou
15 homólogo dele, em condições severas.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de usar pelo menos um par de primers de oligonucleotídeos adequado para amplificar uma região do gene
20 SAL1, ou de homólogo dele, em que o par de primers possui um primer direto e um reverso para detectar a presença, ou ausência, de mutação na região referida.

25 44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a referida região inclui o gene SAL1 completo, ou homólogo dele.

45. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a referida região inclui uma porção do gene
30 SAL1, ou de homólogo dele.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a referida região inclui exon 3, o íntron entre os exons 3 e 4, exon 5, o íntron entre os exons 5 e 6, exon 6, e o íntron entre os exons 6 e 7, ou qualquer
35 combinação desses.

FIGURA 1A

Col-0 nativa

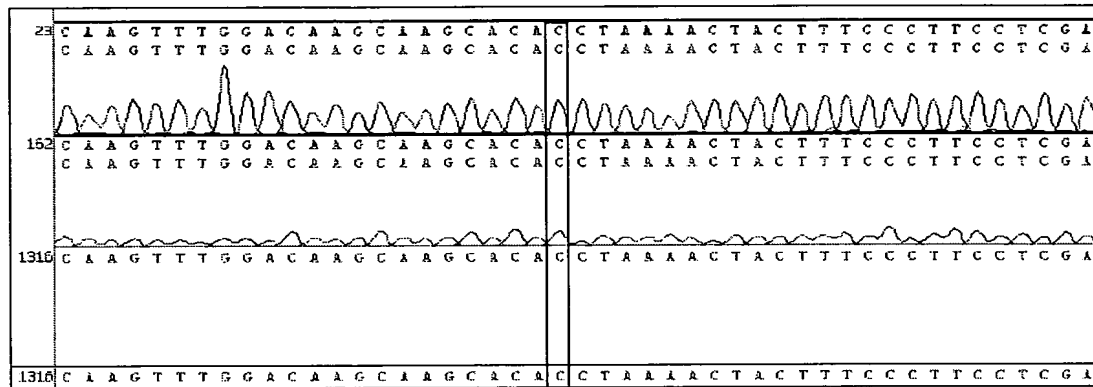
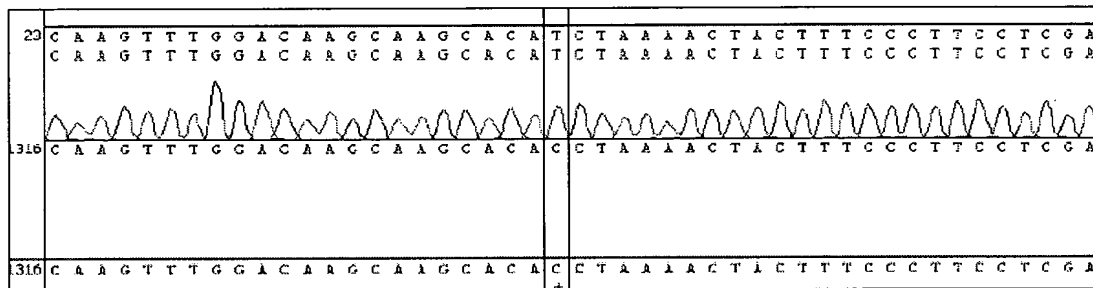
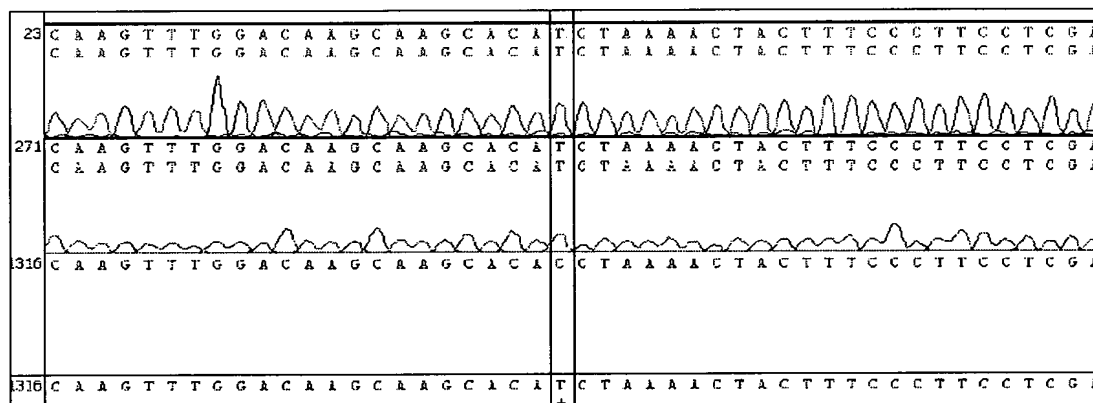
*alx8* – linhagem original (pool M6)*alx8* – 1º cruzamento reverso

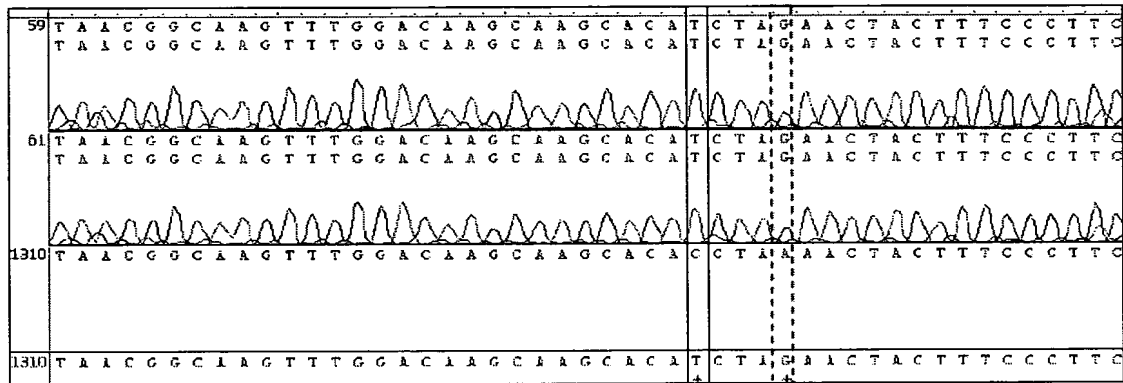
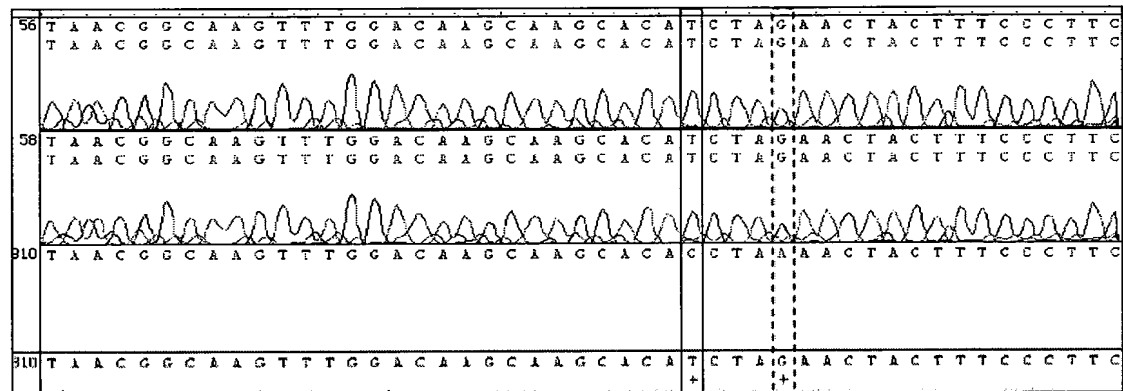
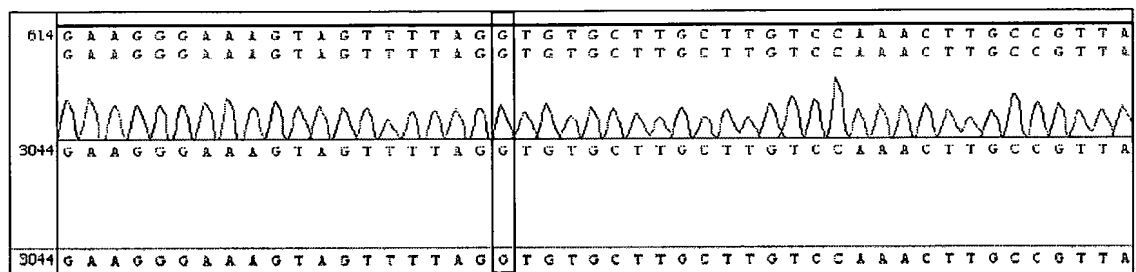
FIGURA 1A (continuação)***alx8* – 3º cruzamento reverso com dCAPS (a->g)*****alx8* – 4º cruzamento reverso com dCAPS (a->g)****Col-0 WT com APX2-LUC**

FIGURA 1B

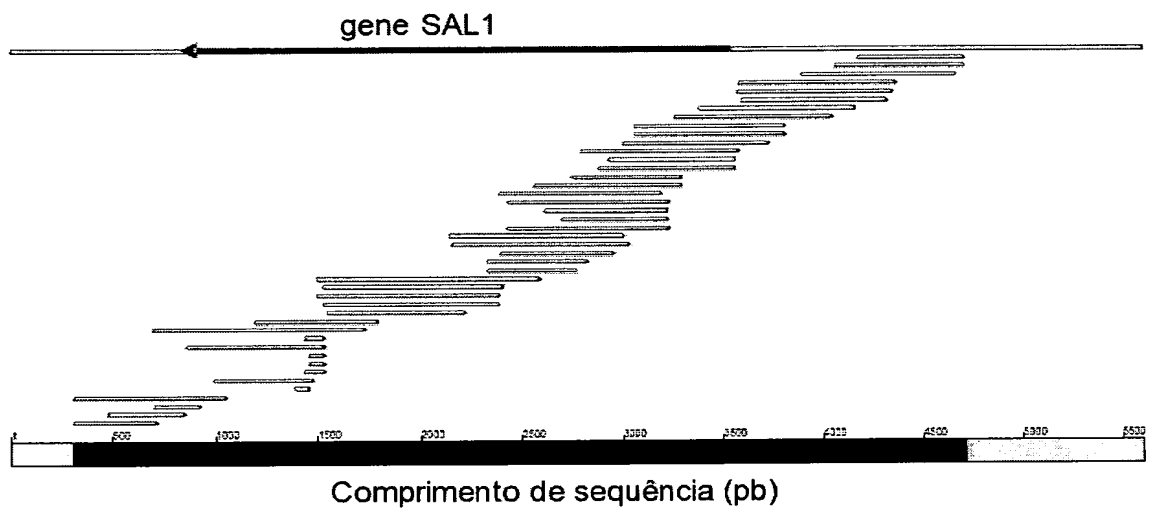


FIGURA 2



FIGURA 3**Sequência de Nucleotídeos Genômica SAL1 - SEQ ID NO:1**

1 gacatatatt tatcttcttg aaaagcgaat gatgtctata aattgttttc gaacagcgaa
 61 ggctccgctt caatcatttg tagcagtaag aacgaattcg agacctagaa attcatcgaa
 121 ccgtctcggtt tctgtattcg gacgcaagtc ttcttctcct tcatttggtta ctctcagagt
 181 tgtttcatcg atggcttacg agaaagagct tgatgctgct aagaaagctg cttcactcgc
 241 tgctcgtctc tgtcagggtta gggttttttc gattcaatca tgacctatag attctaaagt
 301 ttgattcttt aagaaacca ttttgtaaatt cttccaaatt tcgtttaaca ttttggtgtt
 361 attgtgcatt gcatctgtaa ttgggaatag attctagtga tatagtgtaa tggtcctcta
 421 catacgaagc tcgtgtaaat ctttgatcaa aatcttatct ttgtgttttg ggtttgtttc
 481 agaaagttca aaaggctttg ttgcaatcag atgtgcaatc aaaatctgat aaaagtccag
 541 tgaccgttgc tgattatggt tagtttggtta tacctgtccc tgattagaaa aagctcttct
 601 ctttgaatgt tactgagatt gttaggaaat cacttaattt gatctgtctt gtgttgaatt
 661 tcaggttcac aagcagttgt tagtttagtc ttagaaaaag agctcagttc tgaacctttt
 721 tcattggtgg ctgaagaggt gaaactgctt aataaatcct tgttagatgt ctcacacttt
 781 acttatcttt gagtttgtgt ttatggactc acattgtcta aaatgatcta tataggactc
 841 aggcgatcta cgcaaggatg gttctcagga tactctggag cgcatacaca aactcgtgaa
 901 cgacactttg gctaccgagg aatcgtttaa tggctctact ttgtctactg atgatctact
 961 tagagccatt gactgtggaa catctgaagg tggtcctaat ggtcgacact gggctcttga
 1021 tccaattgat ggcaactaaag ggtacgtttt aaaactaact agcctaaagt caaatcttct
 1081 tatcttcagag aaaatgtaaa ttgatagaa tgttgagtca gatgttatgt tcctgacact
 1141 gagcattttc atgatttttag atttctgagg ggagatcaat acgcagtagc actaggattg
 1201 ctcgaggaag ggaaagtagt tttaggtgtg cttgcttgtc caaacttgcc gttagcatcc
 1261 atagcaggaa acaacaagaa caaatcttcg tcagacgaaa ttggatgcct cttctttgct
 1321 acaattgggt cagggacata tatgcagctc ctagattcaa aatcttctcc tgtaaaagtg
 1381 caagtctcta gtgttgagaa tcctgaagag gcatcgttct tcgagtcatt cgaaggagct
 1441 cactctctac atgacttatc cagctccatt gccaatgtaa attgcttctt tccttccatg
 1501 tgattccagc taatagctaa ctaattttcc tcatccattt gatcatgttc tatgttgtaa
 1561 tatacagaaa ctcggtgtca aagctccacc agtccgtatt gatagccaag caaagtatgg

FIGURA 3 (continuação)

1621 agctttatca agaggagatg gagctatata cttacggttt cctcataaag gataccgcga
 1681 aaagatttgg gaccatgtcg ctggtgctat agttgttaca ggtaacatta aagcttactc
 1741 tctatgaagc taattttata gtgtcgacat gcggatgtaa atagataagg aatgcaaggt
 1801 tgattcttct ttttggtgca gaggcgggtg gaatagtgac agatgcagca ggaaagccac
 1861 tggatttctc gaaagggaag tatcttgatt tggacacagg cattatcggt gctaacgaga
 1921 agctaattgcc tctgcttttg aaagcagttc gtgactccat agctgagcaa gagaaagctt
 1981 cagctctctg atttgttttt ttctctcgta cgttctttgt ttctctgtaa ctgttgtttc
 2041 attttctttc accgaatttc accagtgaga atttcttcca ttttcgaaaa agaaataaaa
 2101 atgaaattct gttttgggct aa

FIGURA 4**Sequência de Aminoácidos de SAL1 - SEQ ID NO:2**

1 MMSINCFRTA KAPLQSFVAV RTNSRPRNSS NRLVSVFGRK SSSPSFVTLR
 51 VVSSMAYEKE LDAAKKAASL AARLCQKVQK ALLQSDVQSK SDKSPVTVAD
 101 YGSQAVVSLV LEKELSSEPF SLVAEEDSGD LRKDGSDQTL ERITKLVNDT
 151 LATEESFNCS TLSTDDLLRA IDCCTSEGGP NGRHWVLDPI DGTGKFLRGD
 201 QYAVALLLE EGKVVLCVLA CPNLPLASIA GNNKNKSSSD EIGCLFFATI
 251 GSGTYMQLLD SKSSPVKVQV SSVENPEEAS FFESFEGAHS LHDLSSEIAN
 301 KLGVKAPPVR IDSQAKYGAL SRGDGAIYLR FPHKGYREKI WDHVAGAIIV
 351 TEAGGIVTDA AGKPLDFSKG KYLDLDTGII VANEKLMPLL LKAVRDSIAE
 401 QEKASAL*

FIGURA 5

CLUSTAL W (1.83) alinhamento de sequências múltiplo

```

arroz      MSQAAGNPYAAELAAAKKAVTLAARLCQAVQKDILQSGVQSKADQSPVTVADYGSQILVS 60
milho      --MASGNPYAAELAAAKKAVTLAAKLCQTVQQDIMHSGVQAKADKSPVTVADYGSQILVG 58
Arabidopsis -----MAYEKELDAAKKAASLAARLCQKQVQKALLQSDVQSKSDKSPVTVADYGSQAVVS 54
           . * ** *****.:***:** * *: :.:**.*:*.*****. :*.

arroz      LVLKMEAPASSSFSHVAEEDSEELRKEGAEIILENITELVNETIVDDGTYS-IYFSKEGI 119
milho      FSLKMDV-SSGPFSLVAAEEALDELRKDGAEIILEDITDLVNETIFDDGSYN-ISFTKEGI 116
Arabidopsis LVLEKEL-SSEPFSLVAAEEDSGDLRKDGSQDTLERITKLVNDTLATEESFNGSTLSTDDL 113
           : *: : :* .**:** * :***:*:: ** **.***.*: : :. :.:.:

arroz      LSAIDDGKSEGGPSGRHVLDPIDGTKGFLRGDQYAIALALLDEGKVVLGVLACPNLSLG 179
milho      LSAIDDGKSEGGPSGRHVLDPIDGTKGFLRGDQYAIALALLDEGKVVLGVLACPNLPLS 176
Arabidopsis LRAIDCGTSEGGPNGRHVLDPIDGTKGFLRGDQYAVLGLLEEGKVVLGVLACPNLPLA 173
           * *** *.*****.*****.*****.***.***.*****.***.

arroz      SIGNLNGG-SSGDQVGALFSATIGCGAEVESLQG-SPAQKISVCSIDNPVEASFFESYEG 237
milho      SINNINGN-SSGDKVGALFSATIGCGAQVESLDG-SPPQKISVCSIDNPVNASFFESYES 234
Arabidopsis SIAGNNKNKSSSDEIGCLFFATIGSGTYMQLLDSKSSPVKVQVSSVENPEEASFFESFEG 233
           ** . * . **.*:*.** *****.*: : :*. . *. .*.*:** :*****.*.

arroz      AHSRLDLTGSIAEKLGVQAPPVRIQSQAKYGALARGDGAIIYLRFPHKGYREKIWDHHAAGS 297
milho      AHSMDLTRLIAEKLGVQAPPVRIQSQAKYGALARGDGAIIYLRFPHKGYREKIWDHAGGS 294
Arabidopsis AHSRLDLSSSIANKLGVKAPPVRIQSQAKYGALSRGDGAIIYLRFPHKGYREKIWDHVAGA 293
           ***:***: ***:***:*****.*****.*****.*****.***.

arroz      IVVTEAGGLVTDASGNDLDFSKGRFLDLDTGIIATNKQLMPSSLKAVQDAIKEQNQAASP 357
milho      IVVTEAGGIVTDAAGKDLDFSKGRFLDLDTGIIATNKELMPSSLKAVQEAIKETNOAASL 354
Arabidopsis IVVTEAGGIVTDAAGKPLDFSKGKYLDLDTGIIIVANEKLMPLLLKAVRDSIAEQEKASAL 353
           *****:***:*: *****:*****.***:*** *****:.* * :.:.:

arroz      L 358
milho      L 355
Arabidopsis -

```

FIGURA 6A

Espécie	EST ID	Identidade (%)
<i>Hordeum vulgare</i> (Cevada)	TC141977	64% & 62%
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	TC233967	68% & 68%
<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	TC298407	66%
<i>Zea mays</i> (Milho)	TC320492	69% & 67%
<i>Solanum tuberosum</i> (Batata)	TC136604	69%
<i>Picea</i> (Abeto)	TC17821	67% & 71%
<i>Pinus</i> (Pinho)	TC67647	65%
<i>Allium cepa</i> (Cebola)	TC448	72%
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)	TC176257	73%
<i>Glycine Max</i> (Soja)	TC216235	74%
<i>Medicago truncatula</i>	TC95084	73%
<i>Gossypium hirsutum</i> (Algodão)	TC28214	74% & 77%
<i>Populus</i> (Álamo)	TC45863	75%
<i>Brassica napus</i> (Colza)	TC9828	88%
<i>Lotus japonicus</i>	TC13858	74%

FIGURA 6B

CLUSTAL W (1.83) alinhamento de seqüências múltiplo

```

Abeto      -----GGTTCTCTGCGACTTGTGTGTATAAGTCTATAACAT 36
Pinho      -----
Medicago  -----TGGGGACGCAGAGTTTGTT---GGGAGGAACAAGAACGGTAGTA 41
Lotus      -----
Soja       --GAAAAAGATGGGTACTCAAACAACACTTTGGTGTAGAGCAAGAAGTACTATAAGTGTGA 58
SAL1      -----GACATATATTTATCTTCTTGAAA 23
Colza      -----
Álamo      -----
Algodão    -----
tomate     -----
Batata     -----
cebola     -----CAATTTGCAAAAGTC 15
Trigo      CTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGCGCGTGGGCCTCCTCCTCGCTCCCTCCTCCCTCGCCC 60
cevada     -----
arroz      -----GTGGAATTCCGGTC 14
milho      -----CGCACATGGCTGCGCGCGTGGGCCTGCTCCC 31

Abeto      CAATCAATGGCGTGGTTCGAGCCGATTCATTTCAATTTACGAGGACTTCTAGTGCCACC 96
Pinho      -----
Medicago  GCAATAAGGGATTGTTGCGAATCCATAAATACAATAATAATAATCAGGAAAAATCCACC 101
Lotus      -----AGAATCTGGAAAACAACCATC 21
Soja       GGAG---GTGATTGGAAGTTG--TTCGAATCC-----AGAATCCGAAAAAAGGGCACC 106
SAL1      AGCGAATGATGTCTATAAATTGTTTTCGAACAGCGAAGGCTCCGCTTCAATCATTTGTAG 83
Colza     -----GGAACAGCCCAGGCACCGCTTCAGACATTTCGCAT 34
Álamo     -----GCCAAATC 8
Algodão    -----GGAATTTTCTTACGAAATTTTGAATTGCAAAATTAATAAATGTCTAT 48
tomate     -----
Batata     -----GCTTTTCACATTATCATCTAGGACTATAAATTCCTTG 36
cebola     CCTCCTCGTCTACACTGTGCTAACCTATCCCCCTTAATCTCGATTAAATGTTCCCCAAT 75
Trigo      GAAACCCACCTCGTGTCTGCCTCCCTTATCCCCTGCTTCCCACCACCTTGGCCGCCCA 120
cevada     -----CAAANAATCCTCACTA 16
arroz      GCGCCGTGCATCTCGTACGTGACGGGGAGGGCGGCCTCAC--CCAGGGATGCTGCAACG 72
milho      GCACGCGATCCTCGTCTCCTCCCGAGCTCTACCCACGCCCCGAGCTCGCGTCCCTTATCC 91

Abeto      TCATTTGTTTTCTTCCAACCTACAA--CCCTACCTCTACAGATACATTTCCCCAGCGTGAG 155
Pinho      -----
Medicago  ACCGTCTCTGGTTTCTCATTATCAT-CATCAACGACA-AGAAGATCCTCTTCATTGTATT 159
Lotus      ACCNGTTGTGATCTTTCAT---CAA-GGGGAAGAAGA-AGAAGACCAGTTTCCTTGTCTT 76
Soja       ACCG-----TGTCAA---CAA-GTAGAAGCAGA-AGCTGTTTTGTCTTCTCGC--C 150
SAL1      CAGTAAGAACGAATTCGAGACCTAGAAATTCATCGAACCGTCTCGTTTCTGTATTTCGGAC 143
Colza     CAGT-----TTCGAAATTCAGATATTCACCGAACCTATCGTTTCTGTATTGAGAA 76
Álamo     ACAATCACGAAAAACCCTTTTCTTG-TTTCCTC-----TCCCCCTTTATTTTCTCTAA 61
Algodão    AAATTGGTTGAGATTGTGTTTCCCCC-TCTCTTAAAAA-GCCCCCTCTTTTTCATCTCTGT 106
tomate     -----AAAATACA-AAACCCCACTTCCCCTTTTCAC 30
Batata     ACACAAAAAACCTGCCATTGTTAA-CAAAAAATACA-AAACCCCATTTCCCCTTTTCAC 94
cebola     AATTATCTCCCCTGCTCTTTTCTCCCA-CCAAATCTAGT-TCACTTTCTTGCTCCTCCGTAT 133
Trigo     CCTACCGCCGATTCGCTCCTCCGCGCGCTGCGCTCCCCCTCTGGTGGCCCCGCCAAG 180
cevada     G--AAGGGAAGACAAAGTTGCAGCGTCAGCGCGA-CCTGCCCCGTGCCGCCCCACCTAC 73
arroz     GCGTCAAGGGGCTGAACAACGCCGC-CCGCACCACCGCCGACCGCCAGGCCGCTGCCGC 131
milho     TCTTCCACCGTCCCTTCTTACCTC--CGCCACGCCTCCTCCTCCGCTCCCGCTCCTGC 149

```

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	TGCGAGGAGGAGCATCACCACCAAGACAACAAGAGCGAAAATGGACATCGGTG-CATACG	214
Pinho	-----CAAGAGTGAAGATGGAGAACAGGG-CATACG	30
Medicago	GTCGTCGTTGGTCAACCATTAAACGACAAATACTTTCTTCTTCTTTAATGTCTTCTTACG	219
Lotus	GTTGTGTGTTCACTACT-----TTCTTCAATGCCT---TACG	109
Soja	GCTGACACTAATCGT-----TTCTTCAATGCCT---TACG	182
SAL1	GCAAGTCTTCTTCTCTTCAATTTGTTACTCTCAGAGTTGTTTCAATCGATGGCT---TACG	200
Colza	GGAAAGTC---GTCTCCTTCAATTTGTTACTCTAAGAGTAGTCTCATCCATGGCT---TACG	139
Alamo	CAAAACCAAAAGCAAAACC-TCAAATCCAAGAGTATTATCTCTTCAATGTCT---TACA	117
Algodão	CACTTGCCCTCCTCCTCCTC-CTTCTTCTTCTGCTGTGATTTGTGG-CAATGTCT---TATG	161
tomate	TTTTGCTCACTCTAAGAGCATCTAAATCAACCTTAAGAGCTGTTACAATGTCTG---TATG	87
Batata	TTTGTCTCACTCTAAGAGCATCTAAATCAACCTTAAGAGCTGTTTCAATGTCTG---TATG	151
cebola	CTCAATTAAAGCCAAGACTGAATCTAGATCTTTATCCATTTCTGCCATGGCTTCGTACG	193
Trigo	CGCCACC--CCTCTTTTCCGCCCGCCCATGTTCAGGGTCCGCCGGTAGCCCCC-CGTACG	237
cevada	CGCCGCCGGCCGCCCAATCGATTG-GCAATGTGCGGCCCGCCGGCAATCCCC-CGTACG	131
arroz	TGCCGCGAGACTCCGCGCCAGCGCCACCATGTGCGAGGCCGCCGGGAACCCC---TACG	187
milho	CGCGCGTCCGCCGCTTTTGTGCGAGTCCGCGCCATGG-CTTCGGGGAAACCCC---TACG	204

Abeto	AACAAGATCTTGCCATTGCAATCAAGGCCGCTCTCTCGCAGCTCGTCTATGCCAGTCGG	274
Pinho	AACAAGATCTTGCCATTGCAATCAGGGCTGCCTCTCTGGCAGCTCGTCTATGCCAGTCAG	90
Medicago	AGAAGGAACTCGCTGCTGCTAAGAAAGCTGCCACTCTCGCTGCTCGTCTTTGCCAGAAAG	279
Lotus	AGAAGGAGCTCGCTGCTGCCAAGAAAGCAGCCACTCTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	169
Soja	AGAAGGAATTCGCCGCTGCAAAAAAGCAGCCACTCTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	242
SAL1	AGAAAGAGCTTGATGCTGCTAAGAAAGCTGCTTCACTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	260
Colza	AGAAAGAGCTTGACGCTGCTAAGAAAGCTGCTTCCCTCACAGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	199
Alamo	ATAAAGAACTTGCTGCTGCCAAGAAAGCTGTCTCTCTTGCTGCCCCGCTCTGCCAGAAAG	177
Algodão	ATAAAGAACTTGCTGCTGCCAAGAAAGCAGCCTCTCTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	221
tomate	ATAAAGAACTTGATGCTGCCAAGAAAGTGTCTCTCTTGCTGCTCGCTCTGTCAAGAAAG	147
Batata	ATAAAGAACTTGATGCTGCCAAGAAAGTGTCTCTCTTGCTGCTCGCTCTGTCAAGAAAG	211
cebola	AGAAAGATCTTACCGCTGCCAAGAAAGGCTGCTTCACTGGCTGCTCGTCTATGCCAAACCG	253
Trigo	CCGCCGAGCTTGCGAGCCGCCAAGAAAGGCCGTCGCCCTTGCCGCCCGCTATGCCAGACTG	297
cevada	CCGTCGAGCTCGGCCGCCGCCAAGAAAGGCCGTCGCCCTCGCCGCCCGCTATGCCAGACGG	191
arroz	CCGCTGAGCTCGCCGCCGCCAAGAAAGGCCGTCACCCTCGCCGCCCGCTCTGCCAGGCCG	247
milho	CCGCCGAGCTCGCCGCCGCCAAGAAAGGCCGTCACCCTCGCCGCCAACTCTGCCAGACAG	264

Abeto	TGCAAAAGAGCCTTTTACAAACAGATACTCAAGCCAAGATGGACAGTTCTCTGTCACTG	334
Pinho	TGCAGAAGAGCCTTTTACAAACAGATACTCAAGCCAAGACGGACAGTTCTCTGTCACTG	150
Medicago	TACAAAAAGCTCTTCTTCAATCTGATGTTCACTCTAAATCTGACAAAACCTCTGTCACTG	339
Lotus	TACAAAAGGCTCTTCTGCAATCCGATGTCCACTCAAAATCAGACAAAAGTCTGTACACG	229
Soja	TACAGAAGGCTCTTCTGCAATCCGATGTGCACTCAAAATCAGACAAAAGTCTGTACACG	302
SAL1	TTCAAAAGGCTTTTGTGCAATCAGATGTGCAATCAAAATCTGATAAAAGTCCAGTGACCG	320
Colza	TTCAAAAGGCTTTTGTGCAATCAGATGTTCATCAAAATCTGATAAAAGTCCAGTGACCG	259
Alamo	TGCAAAAAGCTATCTTGCAATCAGATGTCCAATCAAAATCAGATAAAAGTCCCGTCACTG	237
Algodão	TACAAAATGCTTTTGTGCAATCCGATGTTCATCAAAAGATGATAAAAGTCCCTGTAACTG	281
tomate	TCCAAAAGCACTGTTGCAAGCAGATGTTCATCAAAAGTCTGACAAATCTCCAGTGACCG	207
Batata	TCCAAAAGCACTGTTGCAAGCAGATGTTCATCAAAAGTCTGACAAATCTCTGTGACCG	271
cebola	TGCAGAAGGCGATATTGCAAGTCCGATGTGCACTCAAAAGCAGATAAGAGTCTGTACTG	313
Trigo	TACAACAGGAAATTTCTGCAATCAGATATTAGTCCAAGGCAGATAAAAGTCTGTGACAG	357
cevada	TGCAGCAGGAAATCGTGCAGTCAGACATTCAATCTAAGGCGGATAAGACTCTGTACACG	251
arroz	TGCAAAAGGACATTTCTGCAGTCTGGTGTTCAGTCTAAGGCGGATCAAAAGTCCGGTGACAG	307
milho	TTCAACAGGATATTATGCATTTCTGGCGTTTCAAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGG	324

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	TTGCGGATTATGGTTCTCAGGCTTTAGTTAGCTTTGTGCTTGAGAGGGAACATA---CAAT	391
Pinho	TTGCAGATTACGGTTCTCAGGCTTTAGTTAGCTTTGTACTTGAAAGGGAATTA---CCCT	207
Medicago	TTGCTGATTATGGTTTCGACAGATCTTGGTCAGCTTGATGCTTCAGAGAGAGCTT---CCTT	396
Lotus	TCGCTGATTATGGTTTCACAAACCTTGGTCAGCTTAATACTCGAGAGAGAACTT---CCTT	286
Soja	TGGCTGATTATGGTTTCACAAGCATTTGGTCAGCTTTATACTTGAGAGAGAACTT---CCTT	359
SAL1	TTGCTGATTATGGTTTCACAAGCAGTTGTTAGTTTAGTCTTAGAAAAAGAGCTC---AGTT	377
Colza	TTGCTGATTATGGTTTCACAAGCAGTTGTCAGCATAGTCTTGGAAGGGAACATC---ACTT	316
Álamo	TTGCTGATTATGGCTCTCAAGCACTAGTTAGTTATGCTCTGCAGCGGGAGCTT---CCTT	294
Algodão	TTGCTGATTATGGCTCACAGCACCTGGTTAGTTTGTGCTGCAGCAGGAATTT---CCTG	338
tomate	TGGCTGATTATGGCTCACAGGCCGTGGTTAGCGTTGTTTTGCAGAAAGAGTTG---TGTT	264
Batata	TGGCTGATTATGGCTCACAGGCCGTGGTTAGCGTTGTTTTGCAGAAAGAGTTG---GGTT	328
cebola	TGGCCGATTATGGTTCCCAAGTATTTGGTCAGTCTTGTTTTTGAGAAAAGAACTT---CCTT	370
Trigo	TAGCTGACTATGGATCTCAAGTATTTGGTAAGCCTTGCGTTAAATATGGAAGTA---ACTT	414
cevada	TAGCTGATTATGGATCTCAGGTATTTGGTGAGTCTTGTTGTTAAATATGGAAGTA---ACCT	308
arroz	TTGCCGATTATGGGTCTCAAATATTTGGTAAGCCTTGCTCTTGAAAATGGAAGCACCAGCTT	367
milho	TGGCTGATTATGGATCTCAAATATTTGGTCCGTTTTCCTTAAAGATGGATGTA---TCAT	381
	* * * * *	
Abeto	CGGGAGTGTTTTCCATGGTTGCAGAAAGAGGATTTCAGGAGATTTACAGAAGAATGATGCAC	451
Pinho	CGGGATTGTTTTCTTGGTTGCAGAAAGAGGATTTCAGGAGATTTACAGAAGAATGATGCAC	267
Medicago	CTGAACCATTTTTCATTTAGTAGCTGAGGAGGATTTCAGGGGATCTTCGTAAGGAAAGTGCC	456
Lotus	CTGAACCATTTTTCATTTAGTAGCTGAGGAGGATTTCAGGCGATCTGCGTGAGGAAAGTGCC	346
Soja	CTGAACCATTTTTCATTTAGTAGCTGAGGAGGATTTCAGGTGATCTTCGTAAGGAGAGTGCTC	419
SAL1	CTGAACCCTTTTTCATTTGGTGGCTGAAGAGGACTCAGGCGATCTACGCAAGGATGGTTCTC	437
Colza	CTGAACCCTTTTTCATTTGGTTCGCTGAAGAGGACTCAGCGGATCTACGCAAGGATGGTTCTC	376
Álamo	CTGAACATTTCTCCTTAGTGGCGGAGGAGGATTTCAGAAGATCTCCTCAAGGATGGTGCC	354
Algodão	ATAAC---TTCTCATTTAGTTGCTGAGGAGGATTTCTAAAGATCTTCGCAAGGATGGTGCC	395
tomate	CTGCTTTCATTTTCATTTAGTGGCTGAGGAGGACTCTGGAGACCTTCGTAATGAAGAGGGAA	324
Batata	CTGCTTTCATTTTCATTTAGTGGCTGAGGAGGACTCTGGAGATCTTCGTAATGAAAAGGGAA	388
cebola	TTGATTCTTTTTTCATTTGGTTGCTGAAGAGGATTTCAGGAGACTTCGGAACAGATGCTGGTC	430
Trigo	CTGGTTTCATTTTTCATTTGGTGGCCGAAGAGGACTCAGAAGACTTGAGAAAGGATAGCGCTG	474
cevada	CTGGTTCTTTTTTCATTTGGTGGCCGAGGAGGATTTCAGAAGACTTGAGAAAGGATGGCGCTG	368
arroz	CTTCTTCTTCTCTATGGTGGCTGAGGAGGACTTCGGAAGAATTGAGGAAAGAAGGCGCAG	427
milho	CTGGACCATTTTTCATTTGGTGGCTGAAGAGGACTCAGATGAATTGAGAAAAGATGGCGCTG	441
	** * * *	
Abeto	AAGATATGGTGGAACGCATTACAGCACTTGTAAATGAAACCATTTCTAATGATAGTGCCT	511
Pinho	AAGATATGGTGGAACGCATTACAGCACTTGTAAATGAAACCATTTCTAATGATGGTACCT	327
Medicago	AAGATACATTGAAGCGCATTACAGATCTTTGTCAATGATACTCTTGTAAATGAAGGATCAC	516
Lotus	ACGATACTTTGAAGCGGATTACAGAACCTTGTCAATGATACTCTTGTAAATGAAGGATCAA	406
Soja	AGGATACGCTGAAGCGCATTACAGAACCTTGTCAATGATACTCTTGTAGTGAAGGATCAA	479
SAL1	AGGATACTCTGGAGCGCATCACAAAACCTGTAACGACACTTTGGCTACCGAGGAATCGT	497
Colza	AGGATATTCTTCAGCGCATCACGAAACCTGTAACGACACTTTGGCTACTGAGGATCTAA	436
Álamo	AGGAAACACTAGAGCGAATCACAAAACCTTGTAAACGATATTCTAGCTACCGATGGATCAT	414
Algodão	AGGAAATAGTAGAGCGCATTACAAAACCTTGTGAACGATTCTCTAATATTGATGGATCAT	455
tomate	AATCAACATTACAGCGTATCATGAAGCTTGTCAATGAAACACTTGTAGTGTGGAACAT	384
Batata	AAGCAACATTACAGCGTATCATGAAGCTTGTCAATGAAACACTTGTAGTGTGGAACAT	448
cebola	AAGAAACATTGAAACGTATTACGAAGCTTGTAAATGACACTCTTCTCTGATAGTACTT	490
Trigo	AAGAAATTCTGGAACATATTACTGATCTTGTAAATGAAACTCTCGCTGAGGATGGTTTCAT	534
cevada	ACGAAATTCTGGAGCGCATTACTGATCTCGTAAACAAAACCTCTCGCTGAGGATGGTTTCAT	428
arroz	AAGAAATTTTAGAAAATATCACCGAGCTCGTAAACGAAACTATCGTAGATGATGGTACAT	487
milho	AAGAAATTTTGGAAGATATTACTGACCTGTCAATGAAACCATCTTTGATGATGGTTTCAT	501
	* * * * *	

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	ATAA-----TATTTCTCCATTAAACAACAGGAGATGTACTTGCAGCAATAGATAGAGGCA	565
Pinho	ATGA-----TATTTCTCCATTAAACAACAGGAGATGTACTTGCAGCGATAGATAGAGGTA	381
Medicago	ATAA-----CATTTCTGCTTTAAACAACAGATGACGTGCTTAATGCCATTGATAATGGTA	570
Lotus	ATAG-----CTTTTCTACTTTAAACAACAGACAATGTGCTTAGAGCCATTGACAATGGTA	460
Soja	ATAG-----CTTTTCTACTTTAAACAACAGATGATGTGCTTGCAGCCATTGACGGTGGTA	533
SAL1	TTAA-----TGGCTCTACTTTGTCTACTGATGATCTACTTAGAGCCATTGACTGTGGAA	551
Colza	CCAAAGCCATTGACTCTACTTTAAACCACAGATGATCTACTCAGAGCCATCGACTGTGGCA	496
Álamo	ATAG-----TGATTCTACTTTTATCCACTGAAGATATGTCAAGGCCATTGACTGTGGAA	468
Algodão	ACAA-----TG---TTACTTTTATCCACAGAAGATATTCTCAGGGCCATTGACAATGGCA	506
tomate	ATGG-----TACTGCCCCATTATCTGAAGAAGATGTCTTGCTGCCATTGATAGTGGTA	438
Batata	ATGG-----TACTGCCCCATTATCTGAAGAAGATGTCTTGCTGCCATTGATAGTGGTA	502
cebola	ATAA-----TGATATAATTTTATCTGAAGAAGATATACTTGTGCGCTATTGATACTGGAA	544
Trigo	ACAA-----CATTTACTTTTCTAAGGAAGGTATCCTCTCTGCAATTGATACTGGGA	585
cevada	ACAA-----CATTTTATTTATCTAAGGAAGGTATCCTCTCTGCACTTGATACCGGGA	479
arroz	ACAG-----CATTTACTTCTCTAAGGAAGGTATCCTCTCTGCAATTGACGACGGCA	538
milho	ATAA-----CATTTCTGTTTACAAAGGAAGGTATCTCTCTGCAATTGATGATGGGA	552
	** * * * * ** * ** ** *	
Abeto	AATCTGAAGGAGGGCCACATGGTCGGCACTGGGTTTTGGACCCCATTTGATGGGACAAAAG	625
Pinho	AATCTGAAGGAGGGCCCCATGGTCGGCATTGGGTTTTAGACCCCATTTGATGGGACAAAAG	441
Medicago	AGTCCGAAGGTGGTTCCATTGGSCGGCACTGGGTTTTGGATCCGATAGATGGTACTAAAG	630
Lotus	AGTCTGAAGGTGGCTCTGTTGGACGGCACTGGGTTTTGGATCCAATAGATGGCACTAAAG	520
Soja	AATCTGAAGGTGGTTTCAGTTGGACGGCACTGGGTTTTGGATCCGATAGATGGTACTAAAG	593
SAL1	CATCTGAAGGTGGTCCAAATGGTCGACACTGGGTCTTGGATCCAATTTGATGGCACTAAAG	611
Colza	CATCTGAAGGTGGTCCATGGTCGACACTGGGTCTTGGATCCCTATCGATGGCACCAAAG	556
Álamo	AATCTGAAGGTGTTCTCGAGGGCAGACACTGGGTCTTGGACCCAATAGATGGCACTAAAG	528
Algodão	GATCTGAAGGTGGTTCCCAAGGTGACACTGGGTTTTGGATCCTATAGATGGTACTAAAG	566
tomate	GATCTGAAGGGGGTCTCTTCTGGTCAGCACTGGGTGTTGGATCCTATTGATGGTACTAAAG	498
Batata	GATCTGAAGGGGGTCTCTTCTGGTCAGCACTGGGTGTTGGATCCTATTGATGGTACTAAAG	562
cebola	AATCTGAAGGAGGCCCTCATGGGCGACACTGGGTACTGGATCCTATAGATGGCACCAAAG	604
Trigo	AGTCTGAAGGAGGTCCATCTGGCCGACATTGGGTCTTGGATCCAATTTGATGGGACTAAAG	645
cevada	AGTCCGAGGGTGGTCCATCTGGCCGACATTGGGTCTTAGATCCAATTTGATGGGACTAAAG	539
arroz	AGTCTGAAGGAGGTCCATCTGGGCAACACTGGGTGCTAGATCCAATTTGATGGGACTAAAG	598
milho	AGTCTGAGGGAGGTCCATCTGGACGACATTGGGTGCTTGATCCGATTGACGGTACTAAAG	612
	** ** ** * ** ** ***** * ** ** ** ** ** ** *	
Abeto	GATTTCTTAGAGGAGACCAATATGCTGTAGCCTTGGGCTTATTGGATGAAGGAGAAGTTA	685
Pinho	GATTTCTTAGGGGAGACCAATATGCTGTAGCCTTAGGCTTATTGGATGAAGGAGAAGTTA	501
Medicago	GT'TTTGTAAGAGGAGACCAATATGCCATAGCATTAGCTCTGCTAGATGAAGGGAAAGTTG	690
Lotus	GGTTTGTAAAGAGGAGACCAATACGCTATTGCATTAGCTTTGCTAAATGAAGGAAAAGTTG	580
Soja	GGTTTGTAAAGAGGAGATCAATATGCTATAGCGTTAGCTTTACTAGATGAAGGCAAAGTTG	653
SAL1	GATTTCTGAGGGGAGATCAATACGAGTAGCACTAGGATTGCTCGAGGAAGGGAAAGTAG	671
Colza	GATTTTGTAGGGGAGATCAGTACGCGGTAGCACTAGGATTACTCGAGGAAGGGAAAGTAG	616
Álamo	GGTTTGTAAAGAGGAGATCAATATGCAATAGCTTTAGCATTGCTAGATGAAGGGACAGTAG	588
Algodão	GT'TTTCTGAGAGGAGATCAATATGCAATAGCATTGGCTTTGCTAGATGAAGGGAAAGTTG	626
tomate	GGTTTCTAAGGGGAGACCAATATGCAATTGCATTGGGATTGCTAGATGAAGGGAAAGTTG	558
Batata	GGTTTCTGAGGGGAGACCAATATGCAATTGCATTGGGATTGCTAGATGAAGGGAAAGTTG	622
cebola	GGTTTGTACGAGGAGATCAGTATGCCATTGCGCTTGCAATTGATAGATGAAGGGAAAGTAG	664
Trigo	GT'TTCTTGAAGGAGGAGGCAATATGCAATCGCACTGGCACTGCTTGATGAGGGCAAAGTTG	705
cevada	GATTCGTGAGAGGAGGCAATATGCCATTGCACTGGCACTGCTTGATGAGGGCAAAGTTG	599
arroz	GT'TTCTTGAAGGGGAGACCAATATGCTATTGCCCTGGCTCTGCTTGATGAGGGTAAAGTTG	658
milho	GT'TTCTTGAAGGGGAGACCAATATGCCATTGCAATTGGCTCTGCTTGATGAAGGTAAAGTTG	672
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	TTTTGGGTGTGCTGGCCTGCCCAAATTTGCCCTGGACATCAGTTAGCATCAGTGC-----	740
Pinho	TTTTGGGTGTGCTGGCCTGCCCAAATTTGCCCTGGACATCAGTTAGCATCAGTGC-----	556
Medicago	TATTGGGTGTCTTGGCTTGTCCAAATCTTCCGCTGGGAACCATTTGGCCGAATCA---AC	747
Lotus	TATTGGGTGTCTTGGCTTGTCCGAATCTTCCACTGGCATCCATTGCCTGTAATCA---GC	637
Soja	TATTGGGTGTCTTGGCTTGTCCAAACCTTCCACTGGCATCCATTGGCTCCAATCA---GC	710
SAL1	TTTTAGGTGTGCTTGTCTTGTCCAAACTTGGCGTTAGCATCCATAGCAGGAAACAACAAGA	731
Colza	TGTTAGGTGTGCTTGTCTTGTCCAAACTTGGCATTAAACATCCATAGCAGGAAACAA---GA	673
Álamo	TGTTGGGCGTCTTGGCTTGTCCAAATCTTCCGTTACCTTCCATTGCTGGTGGCTC---TC	645
Algodão	TCC'TGGGTGTGCTGGCTTGTCCAAATCTTCCACTAAC'TTCCCTCAGTGATGCTGG---TC	683
tomate	TTTTGGGCGTCTTAGCCTGTCCAAATCTTCCATTATCTTCTCTTGCCTCCACAA---TC	615
Batata	TTTTGGGCGTCTTATCCTGTCCAAATCTTCCATTATCTTCTCTTGCCTCCACAA---TC	679
cebola	TTCTCGGAGTCTTTTCATGTCCGAATCTTCCCTTACCCCAATTGGTAGTTCTAA---TA	721
Trigo	TTTTGGGCGTGTGGGATGTCCAAATCTTCCCTTTGACATCAATAAGCAACCTCAA---TG	762
cevada	TC'TTAGGTGTGTGGGATGTCCAAATCTTCCCTTTGACATCAATAAGTAACCTCAG---TG	656
arroz	TTTTGGGTGTATTGGCTTGTCCAAACCTTTCTTTGGGATCAATAGGCAACCTTAA---TG	715
milho	TTTTGGGTGTATTGGCTTGTCCAAATCTTCCATTGTTCATCAATAACAACATCAA---TG	729
	* * * * *	
Abeto	-CCGCCCTTCAAATGATCCAATTTGGTTGCCTTTTTTCTGCAAGAAAAG-----	787
Pinho	-TCGCCCTTCAAATGATCCAATTTGGTTGTCTTTTTTCTGCAATAAAAGGAGCTGGAACATA	615
Medicago	CGCATTTCTTCTTCTAATGAAGTTGGGTGTCTTTTCTTTGCCAAAGTTGGCAATGGAACAT	807
Lotus	AGCATTTCTACTTCTAATGAAGTTGGTTGTCTTTTCTTTGCTAAAGTTGGCGATGGAACAT	697
Soja	AGCATTTCTTCTTCAAATGAAGTTGGTTGTCTTCTTCTTTGCTAAAGTTGGTGATGGAACAT	770
SAL1	ACAAATCTTCGTCAGACGAAATTTGGATGCCTCTTCTTTGCTACAATTGGTTTACGGGACAT	791
Colza	ACTCTTCTTCTTTCAGACGAAATCGGATGCA-CTTCTTTGCTACGATTGGT-CAGGGACAT	731
Álamo	AGCATTTCTTTGCCTGGCGAAGTTGGTTGCCTTTTTCTTTTCTGTAGTTGGGGGTGGAACCTT	705
Algodão	AGCATTTCTCCAAATAATAAAGTTGGCTGCCTTTTCTTTGCTGTAGTAGGTGGTGGAACTT	743
tomate	TACAGGATGATCAAGACAAAGTTGGTTGCCTTTTTTATGCCCCAAGTTGGTTCTGGAACCTT	675
Batata	TACAGGATGATCAAGACAAAGTTGGTTGCCTTTTTTATGCCCCAAGTTGGTTCTGGAACCTT	739
cebola	CAAATCTTACTGAAAACCAAGTTGGCTGTCTTTTCTCTGTAAAATTGGTTGTGGAACAG	781
Trigo	GTAGCTCATCAGGAGATCAAACGGGGGCCCTCTTTTTCAGCTACAATTGGTTGTGGTGCTG	822
cevada	ATAGCTCATCAAGAGATCAAACGGGGGCCCTCTTTTTCAGCTGCAATCGGTTGTGGTGCTG	716
arroz	GTGGCTCCTCGGGAGATCAAGTTGGTGCTCTCTTTTCTGCTACTATTGGTTGTGGAGCTG	775
milho	GTAAC'TCTTCGGGAGATAAAGTTGGTGCCCTGTTTTCTGCTACAATTGGTTGTGGGGCTC	789
	* * * * *	
Abeto	-----TGCCGTTG--	795
Pinho	CTG-TGCAATCATTGGATGGTTCTATACAACCTAAAAGGGTTTATGTAAGTGCCATAG--	672
Medicago	ATA-TGCAAGCATTGGAT---GGTACTACACAAACTAAGGTGAATGTTAGTACTGTTG--	861
Lotus	TTA-TGCAGGCAATGGAT---GGTTCTACACAGACTAGGGTGATGTCTGTGATATTG--	751
Soja	ATA-TGCAAGCACTGGGC---GGTTCTACACAAACTAGGGTGATGTCTGTGATATTG--	824
SAL1	ATA-TGCAGCTCCTAGATTCAAAATCTTCTCCTGTAAAAGTGCAAGTCTCTAGTGTG--	848
Colza	ACA-TGCAGCCCTTAGACTCGAAATCGAACAGTC-----	764
Álamo	ACA-TGCAGCCACTGGAT---AGCTCTTCAGCAGTGAAGGTGCAAGTCAACGCTACTG--	759
Algodão	ATA-TGCAGCCACTTGAT---GGTTCTTCCGGCAGTAAAGGTGCAAGTAAAGTGCTGTTG--	797
tomate	ATA-TGCAGTCTCTTGAT---GGCTCTACACCAATAAAGGTGATGTAAGTGAATTAG--	729
Batata	ATA-TGCAGTCTCTTGAT---GGCTCTACACCAATAAAGGTGATGTAAGTGAATTAG--	793
cebola	AGAATGCAATCACTAGAAT---GGTTCCGGTGTCTGTCAAAGGTACATGTTAGCAATATCG--	837
Trigo	AAG-TAGAGTCATTAGAG---GGCTCTCCACCACAAAAGATTAGTGTGTTGTACCATCG--	876
cevada	AAG-AGCAGTCTTTGGAT---GGCTCTCCACCACAAAAGATTAGTGTGTTGTACCATCATT	772
arroz	AAG-TAGAGTCTTTACAG---GGCTCTCCAGCACAAAAGATTAGTGTCTGTTCCATCG--	829
milho	AAG-TAGAGTCTTTAGAT---GGCTCTCCACCACAAAAGATTAGTGTGTTGTCCATCG--	843

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	---AAAAGTC---TGAAGATGCA-TCTTTCTTTTGAA-TCATATGAG-GCAG-CACATTCC	845
Pinho	---AAAAGTC---TGAAGAAGCA-TCTTTTTTGGAA-TCATACGAG-GCAG-CACATTCC	722
Medicago	---ACAATCC---AGAAGAAGCA-TCATTTTGTGAA-TCATTATGAA-GCAG-CACACTCC	911
Lotus	---ATAATCC---AGAAGAGGCA-TCATTTTGTGAG-TCTTTTGAA-GCAG-CGCACTCC	801
Soja	---ATAACCC---AGAGGAAGCA-TCATTTTTCGAA-TCTTTTGAA-GCAG-CACACTCC	874
SAL1	---AGAATCC---TGAAGAGGCA-TCGTTCTTCGAG-TCATTTCGAA-GGAG-CTCACTCT	898
Colza	-----	
Álamo	---ACAATCC---TGAAGAAGCA-TCGCTCTTTGAA-TCATATGAA-GCAG-CACACTCC	809
Algodão	---AAAATCC---TGAAGAAGCA-TCATTCTTTGAG-TCTTATGAA-GCAG-CACACTCC	847
tomate	---ACAACCC---TGAAGAGGCA-TCTTTTTTTGAA-TCTTTTGAA-GCAG-CACATTCT	779
Batata	---ACAACCCC---TTGAAGAGGCA-TCTTTTTTTGAAATCTTTTGAAAGCAGACACATTTC	848
cebola	---AAAATCC---AGCCGACGCA-TCATTCTTTGAA-TCATATGAA-GCTG-CTCATTCT	887
Trigo	---ACAATC---CAGTGAATGCC-TCGTTCTTTGAA-TCCTATGAA-GGAG-CACACACA	926
cevada	GCTACAAATAAACAGTCAATGCCATCAGTCCCTTGAA-GCCTATCAA-GGAG-CACACACC	829
arroz	---ACAATC---CAGTCGAAGCT-TCATTCTTTGAG-TCCTACGAA-GGGG-CACACTCC	879
milho	---ACAATC---CTGTCAATGCA-TCATTTTTTGAA-TCCTATGAA-AGTG-CACACTCC	893
Abeto	AT--GCATGACTTG--ACAGCTACAATAGCAAA-GATCCTG--GGTGTAAGCACCACC	898
Pinho	AT--GCATGACTTG--ACGGCTACAATAGCGAA-GATCCTG--GGTGTAAGCACCACC	775
Medicago	TC--ACATGACTTG-TCTAGCACT-ATTGCACT-AAAATC--GGCGTCAAAGCACCACC	964
Lotus	TT--ACATGACTTG-TCTAGCTCC-ATTGCAGA-AAAATC--GGTGTAAGCACCACC	854
Soja	TT--GCATGACTTA-TCTAGCTCA-ATCGCAGA-AAAATC--GGTGTAAGCACCACC	927
SAL1	CT--ACATGACTTA-TCCAGCTCC-ATTGCCAA-TAAATC--GGTGTAAGCTCCACC	951
Colza	-----	
Álamo	AT--GCATGATCTA-TCTAGTTCA-ATTGTCAA-AAAATC--GGTGTAAGCACCACC	862
Algodão	AT--GCATGATTTA-TCTAGCTTG-ATTGCCCA-AAAATC--GGCGTCAAAGCACCACC	900
tomate	TT--GCATGACCTA-TCTAGTTTG-ATAGCAAA-GAAATC--GGTGTAAGCACCACC	832
Batata	TTTGGCATGACCTAATCTAGTTTGGATAGCAAA-GAAACCTTGGGTGGTAAAAGCCCCGC	907
cebola	CT--ACATGACTTA-TCTAGCTCC-ATAGCTAA-GAAGCTT--GGCGTGCAAGCACCACC	940
Trigo	AT--GCATGATTTA-ACTGGCTCT-ATAGCGGA-GAAATC--GGTGTAAGCTCTCTCC	979
cevada	AA--GCGAGAAAAA-ACAGGCCCC-GTAGCCAATGAAAAAG--GGTGTAAGCTCTCTCC	883
arroz	TT--GCGTGATTTA-ACAGGCTCC-ATTGCGGA-GAAATC--GGTGTAAGCTCTCTCC	932
milho	AT--GCATGATTTG-ACTGGCTCT-ATTGCAGA-GAAATC--GGTGTAAGCTCTCTCC	946
Abeto	AGTTA--GAA--TAGATA-GTCAGGCAAAATA-----TGGAGCAATGGCAAG-GGGTGAT	947
Pinho	AGTTA--GAA--TAGATA-GTCAGGCAAAATA-----TGGTGCAATGGCAAG-GGGTGAT	824
Medicago	AGTCA--GAA--TTGACA-GCCAGGCAAAATA-----CGGAGCTCTATCCAG-AGGAGAT	1013
Lotus	AGTCA--GAA--TTGACA-GCCAAGCAAAATA-----TGGAGCTCTGT-----	892
Soja	AGTCA--GAA--TTGATA-GCCAAGCAAAATA-----TGGAGCTTTGTCAAG-AGGAGAT	976
SAL1	AGTCC--GTA--TTGATA-GCCAAGCAAGTA-----TGGAGCTTTATCAAG-AGGAGAT	1000
Colza	-----	
Álamo	AGTTA--GAA--TTGATA-GCCAAGCAAGTA-----TGGCGCTCTGTCTAG-AGGAGAT	911
Algodão	GGTTA--GAA--TTGATA-GCCAGGCGAAGTA-----TGGTGCTCTATCCAG-AGGAGAT	949
tomate	AGTTC--GAA--TAGACA-GCCAGGCAAGTA-----TGGTGCTTTGTCCCG-TGGAGAT	881
Batata	AGGTC--GA--TATACACGCGGGGCAAGA-----GGGGCTTCGCCCCGGCGAAAAAT	955
cebola	TGTAA--GAA--TTGATA-GCCAGGCAAAATA-----TGGTGCTCTTTACAG-AGGAGAT	989
Trigo	AGTCA--GAA--TAGATA-GCCAAGCAAAATA-----TGGTGCTCTGGCCCG-TGGCGAT	1028
cevada	AGTCACTGAAGTTAGATA-GCCAACCAAAATAATGATCGCTATGCTACTCCG-TGGACAT	941
arroz	AGTTA--GAA--TTGATA-GCCAAGCAAAATA-----CGGTGCCCTAGCCCG-AGGTGAC	981
milho	AGTTA--GAA--TCGACA-GCCAAGCAAAATA-----TGGTGCTCTGGCCCG-AGGTGAT	995

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	GGAGCAAT----	ATATCTTCGCTTTTCCTCGTCCAGGCTATCGTGAAAAGATTTGGGATCA	1003	
Pinho	GGAGCAAT----	ATATTTTTCGCTTTCCCTTGTCCAGGCTATCGTGAAAAGATTTGGGATCA	880	
Medicago	GGGGCTAT----	ATATTTTTCGCTTTCCCCAACAAAGGATACCGTGAAAAAATATGGGATCA	1069	
Lotus	-----	-----	-----	
Soja	GGGGCTAT----	ATATTTTTCGCTTTCCCTCACAGAGGATACCGTGAAAAAATATGGGATCA	1032	
SAL1	GGAGCTAT----	ATACTTACGGTTTTCCTCATAAAGGATACCGCGAAAAGATTTGGGACCA	1056	
Colza	-----	-----	-----	
Álamo	GGGGTCAT----	ATACTTTCGCTTTCCACATAAAGGTTACCGTGAGAAAATATGGGATCA	967	
Algodão	GGAGCCAT----	ATATCTGCGTCTTCCACACAAAGGGTATCGAGAAAAAATATGGGATCA	1005	
tomate	GGAGCAAT----	ATATCTGCGGTTTTCCTCATAAAGGCTACCGCGAGAAGATATGGGATCA	937	
Batata	GGCACAAA-----	TAATCTNCGGGGTCCCCAAAAAGGG--ACCAGGAAAAATATCGGGACCA	1009	
cebola	GGTGCTAT----	ATATTTTACGGTTTCCACATAAAGGGTACCGTGAGAAAATTTGGGATCA	1045	
Trigo	GGTGCCAT----	TTACTTTCGCTTTTCCACACAAGGGTTATAAGGAAAAGATATGGGATCA	1084	
cevada	GGATGCACACGTGTTAATGGCGTAACCCACACGAGGGTTACAGGGAAAACAATATGGGATCA	1001		
arroz	GGTGCCAT----	TTACTTTCGCTTTTCCACACAAAGGTTACAGAGAGAAGATCTGGGATCA	1037	
milho	GGCGCCAT----	TTACTTTCGCTTTTCCACACAAAGGTTATAGAGAGAAAATATGGGACCA	1051	
Abeto	TGCAGCTGGTTGTCATCGTAATCCAAGA-----	GGCTGGTGGTGGTT	1043	
Pinho	TGCAGCTGGTTGTATTGTGAATCCAAGAAAATTCATCCGAATTGCAGAGGCTGGTGGTGGTT	940		
Medicago	TGCTGCTGGTTGTATTGTTGTGTAGTGA-----	AGCTGGAGGTATT	1109	
Lotus	-----	-----	-----	
Soja	TGCTGCTGGCAGCATTTGTTGTGACTGA-----	AGCTGGAGGTATT	1072	
SAL1	TGTCGCTGGTGCTATAGTTGTTACAGA-----	GGCGGGTGGGAATA	1096	
Colza	-----	-----	-----	
Álamo	TGCTGCTGGATGCATAGTTGTATCAGA-----	AGCTGGGGGACTG	1007	
Algodão	TGCTGCTGGGTGTATTGTTGTGAGTGA-----	AGCTGGGGGTGTG	1045	
tomate	TGCTGCTGGATATCTCGTTGTTGCAGA-----	AGCTGGAGGTGTT	977	
Batata	CG-----	GGGGAGACTCCTGGGGCACA-----	CAGCGGGGG--GTC	1043
cebola	TGCAGCTGGCTGCATTGTCGTACAGA-----	AGCTGGAGGGGTA	1085	
Trigo	TGCAGCTGGCGCAATTGTCGTACAGA-----	AGCTGGAGGTGTA	1124	
cevada	TGCAGCTGGCTCAATTGTCGTACGGA-----	AGCTGGAGGTGTA	1041	
arroz	TGCAGCTGGGTCAATCGTCGTACAGA-----	AGCTGGAGGTCTG	1077	
milho	TGCAGCAGGATCAATTGTCGTACAGA-----	AGCTGGAGGCATA	1091	
Abeto	GTGGTTGATGCTGCTGGGAAACCTCTTGATTTC	TACAGGGGAGGTATCTGGATGTGGAA	1103	
Pinho	GTAGTTGATGCTGCTGGGAAACCTCTTGATTTC	TACAGGGGAGGTATCTGGATGTGGAA	1000	
Medicago	GTCTCAGATGCTGCCGGAACCCCTTTGGACTTCT	CAAAAGGAAAGTTCTTGTATGTTGAT	1169	
Lotus	-----	-----	-----	
Soja	GCCATGGATGCTGCGGGGAACCCCTTTGGACTTTT	CAAAAGGAAAGTTTCTTGTATGTTGTA	1132	
SAL1	GTGACAGATGCAGCAGGAAAGCCACTGGATTTC	CGAAAGGGAAGTATCTTGTATTGGAC	1156	
Colza	-----	-----	-----	
Álamo	GTCACAGATGTTGCGGGGAACCCCTTAGATTTTT	TCAAGAGGAAGATACCTGGATCTTGAC	1067	
Algodão	GTCACAGATGCTGCAGGGCAGCCATTGGATTTTT	TCAAGGGGAAGTATCTTGTATCTGGAC	1105	
tomate	GTCTCAGATGCTGCAGGAAACCCCTTTGGACTTCT	TCCAAGGGAAGATACCTTGTATTACAC	1037	
Batata	CACACAAG--GCGACAG-----	-----	1058	
cebola	GCAACCGATGCTGCTGGGAATGCCTTAGA--TTCT	CGAAAGGAAGTATCTTTGAT--TAAT	1142	
Trigo	GTAACAGATGCCTCAGGAAACGATCTCGATTTC	CGAAAGGGAGATTTCTTGTATGTTGAC	1184	
cevada	GTTAAAGATGCCCTCAGGAAACGATCTCGATTTC	CGAAAGGAAGATTTCTTGTATCGTGAC	1101	
arroz	GTGACAGATGCATCAGGAAACGATTGGATTTC	TCCAAAGGGAGATTTCTTGATCTCGAC	1137	
milho	GTAACAGATGCTGCGGGGAACGACTTGGATTTC	TCCAAAGGGAGATTTCTGGATCTCGAC	1151	

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	AGGGGTATAATTGCAACCAATGCCAAACTGATGCCATTGCTTC-TTAATGC-AGTGCAAG	1161
Pinho	AAGGGTATAATTGCAACCAATGCCAAACTGATGCCATTGCTTT-TTAATGC-AGTGCAAG	1058
Medicago	ACTGGTATTATTGTTACAAACCAGAACTTGATGCCTTCGCTTT-TGAGAGC-AGTTAAAG	1227
Lotus	-----	
Soja	TCTGGTATTATTGTTACAAACCAGAAATTGATGCCATCACCTTC-TGACAGC-AGTTAAAG	1190
SAL1	ACAGGCATTATCGTTGCTAACGAGAAGCTAATGCCTCTGCCTT-TGAAAGC-AGTTCGTG	1214
Colza	-----	
Álamo	ACAGGCATCATTTGTTACGAATCAGAAACTGATGCCATTACTTT-TGAAGGC-AGTTAGAG	1125
Algodão	ACAGGCATCATTTGTCACCAACCAGAAGTTGATGCCATTACTGT-TTAATGC-AGTTAGAA	1163
tomate	GAAGGCATAATCGTTACCAATCAAAAGCTGATGCCTGCTCTCC-TCAAGGC-TGTTAAAG	1095
Batata	-----	
cebola	ACAGGCAT-ATTGTCACCAAC--AGAGCTGATGCCAAAACCTTT-TGGAGCC-GTACAAT-	1196
Trigo	ACAGGCATCATTTGCCACAAATAAGCAGTTGATGCCATCACCTGC-TGAAGTC-TGTCCAGG	1242
cevada	ACAGGCATCATTTGCTACAAATAAACAGTTGATGCCATCAGTNCCTGAAGTNC-TGTCCAGG	1161
arroz	ACAGGGATCATCGCGACGAACAAGCAGCTGATGCCTTCACCTCC-TGAAGGC-TGTGCAAG	1195
milho	ACAGGCATCATCGCAACCAACAAGGAGTTGATGCCGTGCTCC-TGAAAGC-TGTCCAAG	1209
Abeto	CTGCTCTGAAGGAAGAAGGAAATGTTGAAAGGCTGGTTCCCTTGTTAGCACCATTCAATTTA	1221
Pinho	CTGCTCTCAAGG-----	1070
Medicago	AATCACTCAATGAGAAAGCATCATCCTTGTAATATCTGTG-AAGTGTATGATTCTACTAC	1286
Lotus	-----	
Soja	AAGCACTCAATGAGAAAGCATCATCCTTGTTGATTTCCATTTAAGCGAATGATTCTACAAA	1250
SAL1	ACTCCATAGCTGAGCAAGAGAAAGCTTCAGCTCTCTGA-----	1252
Colza	-----	
Álamo	AATCCATAGAGGAGAAAGCTTCATCATTTGTGATTC--TTT--ACTGATGAATGAAGTCAT	1181
Algodão	AATCTATCCAGGAGAAAGCTTCATCTTTGTGATTTCAATTTT--AGAGGCAGGCTTCATCCT	1221
tomate	AATCTTTGAATGAGAAAGCTTCATCCTTGTTGATGATCAAA--CCAATAACAATACGCTGC	1153
Batata	-----	
cebola	-----	
Trigo	AGGCCATCAAGGAGAAAAAGCCAGGCCCTTCCCCATTGTAGAAGCTTTTTTGGTTTGAAC	1302
cevada	AGGCAATCAAGGAGAAAAAACAGGCCCTCTTCTCCATTGTAAAAGGTTTTTTTAACCTTNC	1221
arroz	ATGCCATCAAGGAGCAAAACCAGGCTGCTTCCCCGTTGTAGTAGCTGTCTCAATCCACAA	1255
milho	AGGCTATTAAAGAGACGAACCAGGCTGCCCTCCCTCTTATAGCTGTTGTAGTGGTCGACAA	1269
Abeto	TTGAACCTAATTAGGGATGGAAGTTGGAACCTTATGCTGATGAAATAAAACAATTCTATTTT	1281
Pinho	-----	
Medicago	TGAGCTTCCTCATTTTGTGTCAGCCAGTTATAT---GAACCTTCCTCTCAATTGTGCTA	1343
Lotus	-----	
Soja	TGAGCTTGCTAACGTTGTTGTCGGCTCGTGTATATGGGGCCTTCCCCCTCAATTGTGCTA	1310
SAL1	-----	
Colza	-----	
Álamo	TTCTCT-----TTGCTAAGTT---TGTTAGCAACTCAAATCAGTTTACGTG----ACT	1227
Algodão	TTCTCTCATAACTTGCTCTGTTAAGCTGGTTGAAACTTGA-TTATTTTGTGCTTCAATGCT	1280
tomate	AGCTATCTTATTTGTAGTTCCAGAAATGGTACTTGCAGCTGCTCATTTTCACCTGTTCTTC	1213
Batata	-----	
cebola	-----	
Trigo	CTTCCCTGTTGTAGTTGGATTGATCCAAAACAATGAT-CGCAATGCCACACC-----	1353
cevada	CCTGT-TACTGAAGTTGGATTGGTTCCAAAATAATGAT-CGCTATGCTACTNCTTGTTC	1279
arroz	TCCAC-AAATATCATAATGTTTCCATATAATAATAAT-TGCAGTGTGCTTCCCCATCAA	1313
milho	AAAAGTAGTTGCAAAATTTTCGTACTGGCAACAGGTGTGCATCATTTCTCCGTGGTATT	1329

FIGURA 6B (continuação)

Abeto	GCACAAGGTCCTTCCTTTAAGAGATATAACTGAGTGTCGTTGGTAGGTGTGTCAACTCTCT	1341
Pinho	-----	
Medicago	CATTTTCATACGCGATCTGATGAAGCTAAGCATATGACTGGACTTCCTCCAACACTTTATT	1403
Lotus	-----	
Soja	TATTTTCAT-----TCTGATGAAGTTAAACAAATGATGGGACTTCCTCTGATACTTCCTT	1364
SAL1	-----	
Colza	-----	
Álamo	TGAATTTTCCACTCTATGTTTGCTCAATGTATGTTGAGCATGAAACTCTTGCAACTTTGTG	1287
Algodão	TGAACTTT-ATCATTCTTCTCCCAATGCTTAT--AGGAAGATTTTCATTTAGCATGC-	1336
tomate	TCCTTCTACACATTTCTGATATCACTTTGTAGCTCTTTGATTGTCATCTCAACTCAGCTT	1273
Batata	-----	
cebola	-----	
Trigo	--TTATTCACACTGT-TCTAT-GTGTAAT--GACCTTTTGTGTTGGGACAAAGGCAAT-C	1406
cevada	T-TTATTCACACTGT-T-TAT-GTGTAAGT--GACCTTTT-GTTGGAAAAATACAAC-C	1331
arroz	CATTACTTTAAATGTGTGTACAGCACCACCTTTGTTGTTGTTGCTGCTGCAAATTCAGTAT	1373
milho	ACAGAGTC TAGCAA- TTTATAGCATCAACCTGATTGGTGATCAGACGTCCATTCGTTTT	1388
Abeto	GGCTCTAGTCCTGGCCACATTTGCAGTGATAGACAATAAGTTGAAAACGGAAGTACATTA	1401
Pinho	-----	
Medicago	TAAATCATATGCCTGTTCTGCTTTTGGCGTGTACTGTCTTCAAGATTCTTGTAATTTAAG	1463
Lotus	-----	
Soja	TGTAGCAGCAGATTTGTGCTCTGGTTTTTGCAGCTGCTATTTTCTTCTCCTTCTATATA	1424
SAL1	-----	
Colza	-----	
Álamo	AAGTTCAAATGTATTATCCGATGCATAATAGTAGTGTCATTCTGCTAAGCTAC-----	1340
Algodão	ATGAACAAGAAATGGGA-CCAATAAATCTCATCTCTACAATTAGACAATGTAATTGTAGA	1395
tomate	TGATAAACATTTGTTGTTCTCTGGTTATGTCAACTCAACTTTGATTAAACATTATATAT	1333
Batata	-----	
cebola	-----	
Trigo	CTTGTTGTATCACATTTGTACATC-TAAGGAGTGGTGACAGCCATGTCT--TAAATAAA	1462
cevada	CTTGTTAT-----	1339
arroz	CTTATTGTTGCACATTTCTGCATC-TA---ATTGGTGGGTGAGCTGGCA---CCACATGA	1426
milho	ACTGAATCACCTTCTTGGTGCAGCATTGCTAGAAGTGGACAACATGAATAATTTGAGTGA	1448
Abeto	ATTTCCTTTAATTTTC-----	1417
Pinho	-----	
Medicago	CTTGAGTTGTAGGTCCCTTTTCTTCTTGCAAGTACTTTTTTCCCTCCCAACTTT---CTT	1519
Lotus	-----	
Soja	CCTGTCTTTTCTCTCCTTTTCTATTATAAAACAGAGATGAGAGATCTTATTTTAAACTT	1484
SAL1	-----	
Colza	-----	
Álamo	-----	
Algodão	CTAGAACTTGAAAGCATGGTCTTAGGCCTTGAGCCTTTCTCTTTGTCTACCTGGCAGTT	1455
tomate	TTCTCTTGGTATGTTTTTTTTT-----	1355
Batata	-----	
cebola	-----	
Trigo	AGAGGCATCTGCCTGCAGTTATAAATATC--TAGCATAGCTTTGTTCACATAAATGTC	1520
cevada	-----	
arroz	ATGTTCTTTTCATCTGGATTGAGAAGAAATAATTAAATTGGCCTGATTCTCCCTAACTCGG	1486
milho	GTCCATAGTTGCCTGAACCTCAGCTTTGGCATTTGAACTGGTTATAGAAATTGTGAA-ATA	1507
Medicago	TTCTATTAAATAGATATTTTATTTTC-----	1544
Soja	GTTTGATAATTAATTCTTCTAGATTACTTG-----	1514
Algodão	GGGTTTAGGTGTAATTAATTAGATAAAGGAAGTGTGTTGTTGAATACAAACATATTACAT	1515
Trigo	AGCAACAACATATCTTTGTGTGAGCAACAGCCAATCTCTTGTATTATTCTTTTCAGAGAT	1580
arroz	GGCAATATTGCT-----	1498
milho	ATTAATGGATATTTGGAAGACAAACTTGAACCTCAAG-----	1544
Algodão	TATTACTAAACTTATTTTCATGGTAAAACAAGTGTGAAGTCCCTCTCCTTCCCGACCGTTTA	1575
Trigo	TTTTGATGTGCAGTTTATCCCCCTTGTTTAAATTACATACAATTCAAGCTATAATCAATA	1640

FIGURA 6B (continuação)

Algodão	CCTTACATGGTTT-----	1588
Trigo	TTAACTCTTATGGTACCAACTAAATCATCATTCATGGGTACTTGCAGACTCAACATTGCA	1700
Trigo	GAGCTAAGGCTAATAGGACTAANCAGGCACATCAGCTGGATACTCTGCAGAATGCTTTTT	1760
Trigo	GATGGTATCCAGCAGCTACCGCTCTTGCTCACNAAGGNTGGGAAGCATTGNTCATAAC	1820
Trigo	ATCANTGAAGAGCTCCGCAAGGCCGTGTTTTGGAACCTCCGGCNACTGAATGGCTTGCAG	1880
Trigo	GAACNTTGCCNANATGTCCTGAGTAAACCCTGAGTGCGCACACATCATCCCTGAACAATT	1940
Trigo	CGTCCNGAGACGGATCCCGTGTCGAAGCCAACNANAACGGCNGANTGGTTAACTCGAGCC	2000

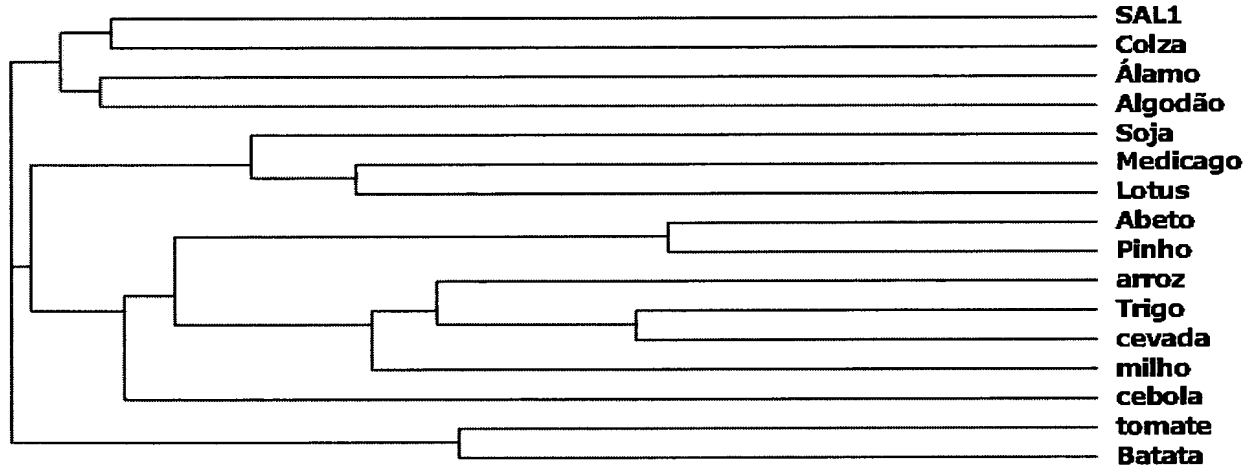
FIGURA 6C

FIGURA 7



<i>alx8</i>		<i>fry1-1</i>	
	Col-0		<i>alx8</i>
Col-0		<i>fry1-1</i>	

FIGURA 8A

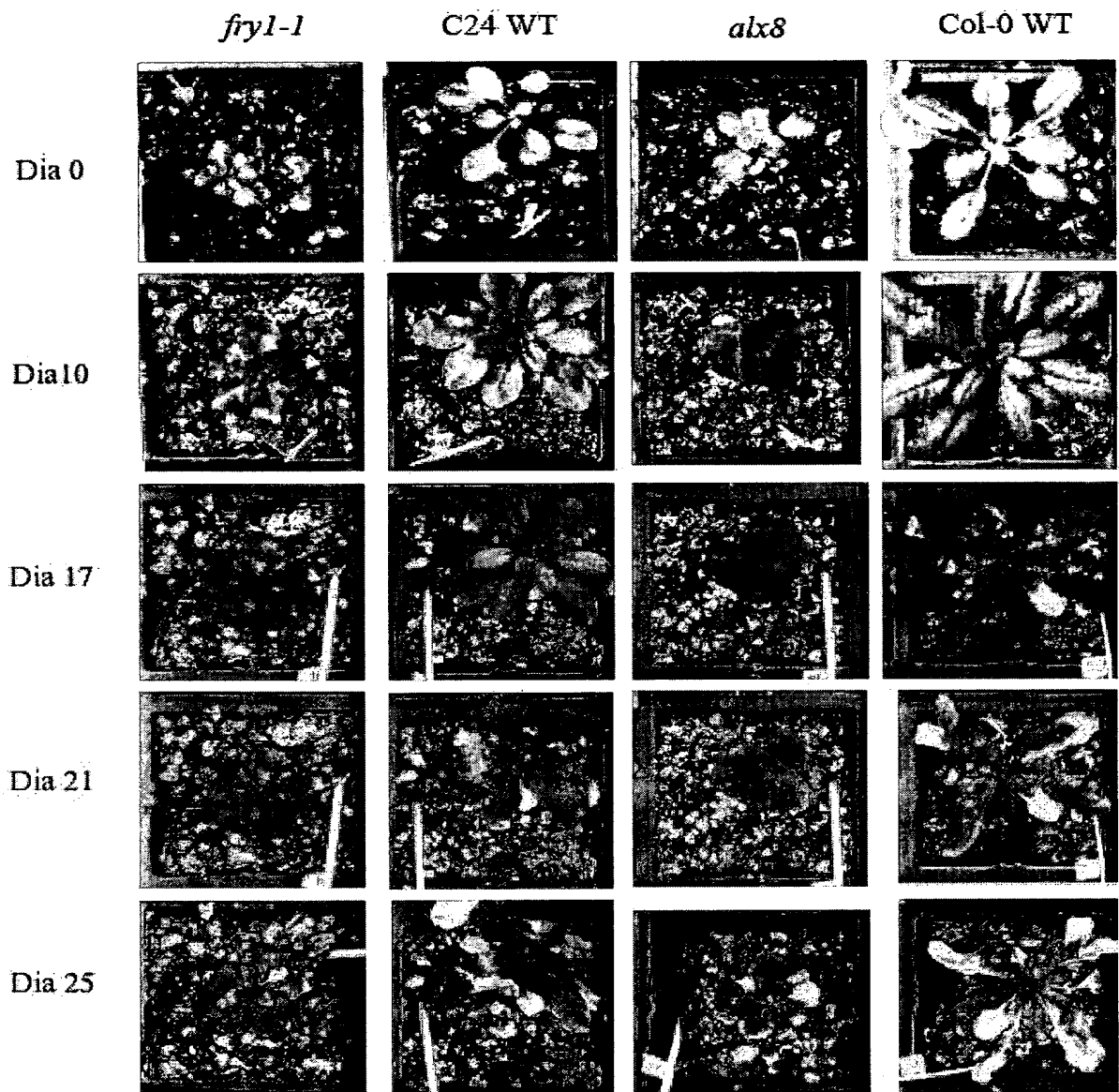


FIGURA 8B

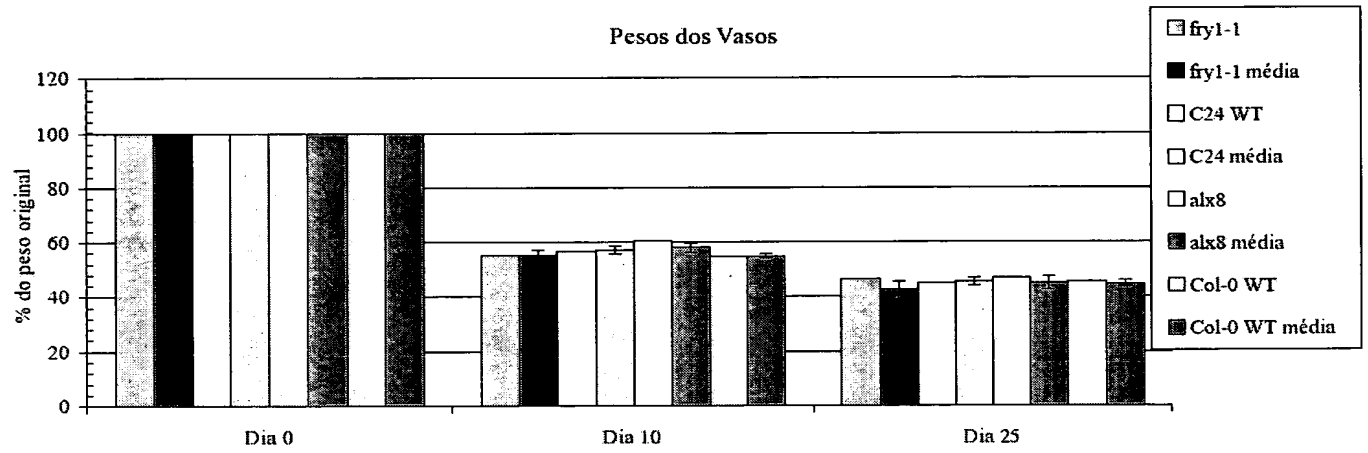


FIGURA 9A

SALK_020882 Sequência Genômica (SEQ ID NO: 3) – de acordo com TAIR

```

1      GACATATATT TATCTTCTTG AAAAGCGAAT GATGTCTATA AATTGTTTTC
51     GAACAGCGAA GGCTCCGCTT CAATCATTTG TAGCAGTAAG AACGAATTTC
101    AGACCTAGAA ATTCATCGAA CCGTCTCGTT TCTGTATTTC GACGCAAGTC
151    TTCTTCTCCT TCATTTGTTA CTCTCAGAGT TGTTCATCG ATGGCTTACG
201    AGAAAGAGCT TGATGCTGCT AAGAAAGCTG CTTCACTCGC TGCTCGTCTC
251    TGTCAAGTTA GGGTTTTTTC GATTCAATCA TGACCCATAG ATTCTAAAGT
301    TTGATTCTTT AAGAAACCCA TTTTGTAAT CTTCCAAATT TCGTTTAAACA
351    TTTTGTGTTT ATTGTGCATT GCATCTGTAA TTGGGAATAG ATTCTAGTGA
401    TATAGTGTA TGGTCCTCTA CACACGAAGC TCGTGTAAT CTTTGATCAA
451    AATCTTATCT TTGTGTTTTC GGTGTGTTTC AGAAAGTTCA AAAGGCTTTG
501    TTGCAATCAG ATGTGCAATC AAAATCTGAT AAAAGTCCAG TGACCGTTGC
551    TGATTATGGT TAGTTTGTTA TACCTGTCCC TGATTAGAAA AAGCTCTTCT
601    CTTTGAATGT TACTGAGATT GTTAGGAAAT CACTTAATTT GATCTGTCTT
651    GTGTTGAATT TCAGGTTTCA AAGCAGTTGT TAGTTTAGTC TTAGAAAAAG
701    AGCTCAGTTC TGAACCTTT TCATTGGTGG CTGA[SALK_020882]AGAGGT
      GAAACTGCCT
751    AATAAATCCT TGTTAGATGT CTCACACTTT ACTTATCTTT GAGTTTGTGT
801    TTATGGACTC ACATTGTCTA AAATGATCTA TATAGGACTC AGGCGATCTA
851    CGCAAGGATG GTTCTCAGGA TACTCTGGAG CGCATCACAA AACTCGTGAA
901    CGACACTTTG GCTACCGAGG AATCGTTTAA TGGCTCTACT TTGTCTACTG
951    ATGATCTACT TAGAGCCATT GACTGTGGAA CATCTGAAGG TGGTCCAAAT
1001   GGTCGACACT GGGTCTTGGA TCCAATTGAT GGCCTAAAG GGTACGTTTT
1051   AAACTAACT AGCCTAAAGT CAAATCTTCT TATTTTCAAG AAAATGTAAA
1101   TTTGATAGAA TGTTGAGTCA GATGTTATGT TCCTGACACT GAGCATTTTC
1151   ATGATTTTAG ATTTCTGAGG GGAGATCAAT ACGCAGTAGC ACTAGGATTG
1201   CTCGAGGAAG GGAAAGTAGT TTTAGGTGTG CTTGCTTGTC CAAACTTGCC
1251   GTTAGCATCC ATAGCAGGAA ACAACAAGAA CAAATCTTCG TCAGACGAAA
1301   TTGGATGCCT CTTCTTTGCT ACAATTGGTT CAGGGACATA TATGCAGCTC
1351   CTAGATTCAA AATCTTCTCC TGTAAGAGTG CAAGTCTCTA GTGTTGAGAA
1401   TCCTGAAGAG GCATCGTTCT TCGAGTCATT CGAAGGAGCT CACTCTCTAC
1451   ATGACTTATC CAGCTCCATT GCCAATGTAA ATTGCTTCTT TCCTTCCATG
1501   TGATTCCAGC TAATAGCTAA CTAATTTTCC TCATCCATTT GATCATGTTT
1551   TATGTTGTAA TATACAGAAA CTCGGTGTCA AAGCTCCACC AGTCCGTATT
1601   GATAGCCAAG CAAAGTATGG AGCTTTATCA AGAGGAGATG GAGCTATATA
1651   CTTACGTTTT CCTCATAAAG GATACGCGA AAAGATTTGG GACCATGTCTG
1701   CTGGTGCTAT AGTTGTTACA GGTAACATTA AAGCTTACTC TCTATGAAGC
1751   TAATTTTATA GTGTCGACAT GCGGATGTAA ATAGATAAGG AATGCAAGGT
1801   TGATTCTTCT TTTTGGTGCA GAGGCGGGTG GAATAGTGAC AGATGCAGCA
1851   GGAAAGCCAC TGGATTTCTC GAAAGGGAAG TATCTTGATT TGGACACAGG
1901   CATATATCGT GCTAACGAGA AGCTAATGCC TCTGCTTTTG AAAGCAGTTC
1951   GTGACTCCAT AGCTGAGCAA GAGAAAGCTT CAGCTCTCTG ATTTGTTTTT
2001   TTCTCTCGTA CGTTCTTTGT TTCTCTGTAA CTGTTGTTTC ATTTCTTTTC
2051   ACCGAATTTT ACCAGTGAGA ATTTCTTCCA TTTTCGAAAA AGAAATAAAA
2101   ATGAAATTCT GTTTTGGGCT AA

```

FIGURA 9B

SALK_020882 Sequência Genômica (SEQ ID NO: 4) – de acordo com estudos de Tail PCR

```

1      GACATATATT TATCTTCTTG AAAAGCGAAT GATGTCTATA AATTGTTTTC
51     GAACAGCGAA GGCTCCGCTT CAATCATTGG TAGCAGTAAG AACGAATTTC
101    AGACCTAGAA ATTCATCGAA CCGTCTCGTT TCTGTATTTC GACGCAAGTC
151    TTCTTCTCCT TCATTTGTTA CTCTCAGAGT TGTTTCATCG ATGGCTTACG
201    AGAAAGAGCT TGATGCTGCT AAGAAAGCTG CTTCACTCGC TGCTCGTCTC
251    TGTCAGGTTA GGGTTTTTTC GATTCAATCA TGACCCATAG ATTCTAAAGT
301    TTGATTCTTT AAGAAACCCA TTTTGTAAAT CTTCCAAATT TCGTTTAAACA
351    TTTTGTGTTT ATTGTGCATT GCATCTGTAA TTGGGAATAG ATTCTAGTGA
401    TATAGTGTA TGGTCCTCTA CATACGAAGC TCGTGTAAT CTTTGATCAA
451    AATCTTATCT TTGTGTTTTG GGTTTGTTTT AGAAAGTTCA AAAGGCTTTG
501    TTGCAATCAG ATGTGCAATC AAAATCTGAT AAAAGTCCAG TGACCGTTGC
551    TGATTATGGT TAGTTTGTTA TACCTGTCCC TGATTAGAAA AAGCTCTTCT
601    CTTTGAATGT TACTGAGATT GTTAGGAAAT CACTTAATTT GATCTGTCTT
651    GTGTTGAATT TCAGGTTTCA AAGCAGTTGT TAGTTTAGTC TTAGAAAAAG
701    AGCTCAGTTC TGAACCTTT TCATTGGTGG CTGA[SALK_020882]TGCTT
751    AATAAATCCT TGTTAGATGT CTCACACTTT ACTTATCTTT GAGTTTGTTG
801    TTATGGACTC ACATTGTCTA AAATGATCTA TATAGGACTC AGGCGATCTA
851    CGCAAGGATG GTTCTCAGGA TACTCTGGAG CGCATCACAA AACTCGTGAA
901    CGACACTTTG GCTACCGAGG AATCGTTTAA TGGCTCTACT TTGTCTACTG
951    ATGATCTACT TAGAGCCATT GACTGTGGAA CATCTGAAGG TGGTCCAAAT
1001   GGTCGACACT GGGTCTTGGA TCCAATTGAT GGCATAAAG GGTACGTTTT
1051   AAACTAACT AGCCTAAAGT CAAATCTTCT TATTTTCAAG AAAATGTAAA
1101   TTTGATAGAA TGTTGAGTCA GATGTTATGT TCCTGACACT GAGCATTTTC
1151   ATGATTTTAG ATTTCTGAGG GGAGATCAAT ACGCAGTAGC ACTAGGATTG
1201   CTCGAGGAAG GGAAAGTAGT TTTAGGTGTG CTTGCTTGTC CAAACTTGCC
1251   GTTAGCATCC ATAGCAGGAA ACAACAAGAA CAAATCTTCG TCAGACGAAA
1301   TTGGATGCCT CTTCTTTGCT ACAATTGGTT CAGGGACATA TATGCAGCTC
1351   CTAGATTCAA AATCTTCTCC TGTAAGAGTG CAAGTCTCTA GTGTTGAGAA
1401   TCCTGAAGAG GCATCGTTCT TCGAGTCATT CGAAGGAGCT CACTCTCTAC
1451   ATGACTTATC CAGCTCCATT GCCAATGTAA ATTGCTTCTT TCCTTCCATG
1501   TGATTCCAGC TAATAGCTAA CTAATTTTCC TCATCCATTT GATCATGTTC
1551   TATGTTGTAA TATACAGAAA CTCGGTGTCA AAGCTCCACC AGTCCGTATT
1601   GATAGCCAAG CAAAGTATGG AGCTTTATCA AGAGGAGATG GAGCTATATA
1651   CTTACGGTTT CCTCATAAAG GATACCGCGA AAAGATTTGG GACCATGTGC
1701   CTGGTGCTAT AGTTGTTACA GGTAACATTA AAGCTTACTC TCTATGAAGC
1751   TAATTTTATA GTGTCGACAT GCGGATGTAA ATAGATAAGG AATGCAAGGT
1801   TGATTCTTCT TTTTGGTGCA GAGGCGGGTG GAATAGTGAC AGATGCAGCA
1851   GGAAAGCCAC TGGATTTCTC GAAAGGGAAG TATCTTGATT TGGACACAGG
1901   CATTATCGTT GCTAACGAGA AGCTAATGCC TCTGCTTTTG AAAGCAGTTC
1951   GTGACTCCAT AGCTGAGCAA GAGAAAGCTT CAGCTCTCTG ATTTGTTTTT
2001   TTCTCTCGTA CGTTCTTTGT TTCTCTGTAA CTGTTGTTTC ATTTCTTTTC
2051   ACCGAATTTT ACCAGTGAGA ATTTCTTCCA TTTTCGAAAA AGAAATAAAA
2101   ATGAAATTCT GTTTTGGGCT AA

```

FIGURA 10

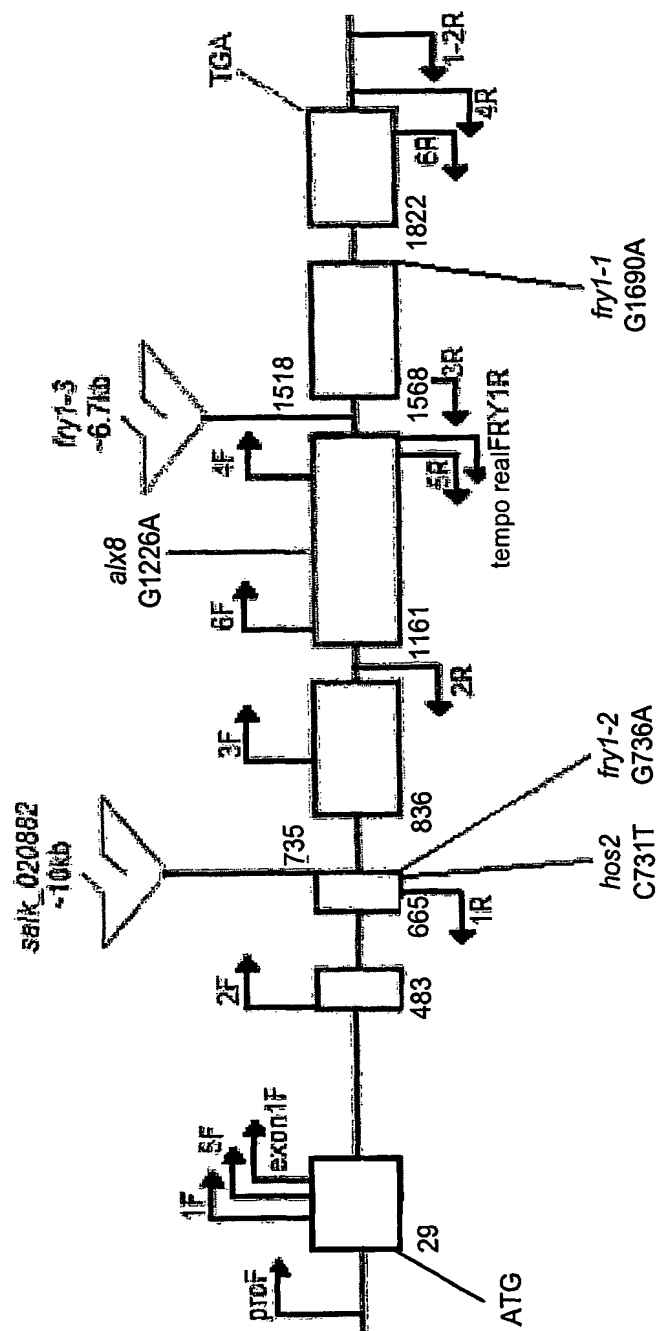


FIGURA 11

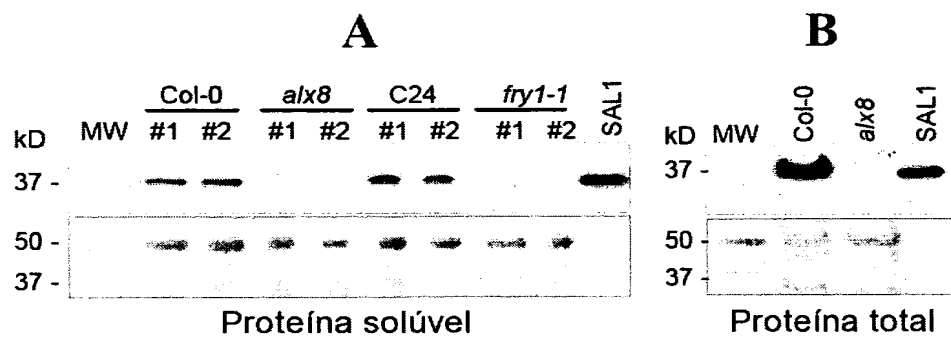


FIGURA 12

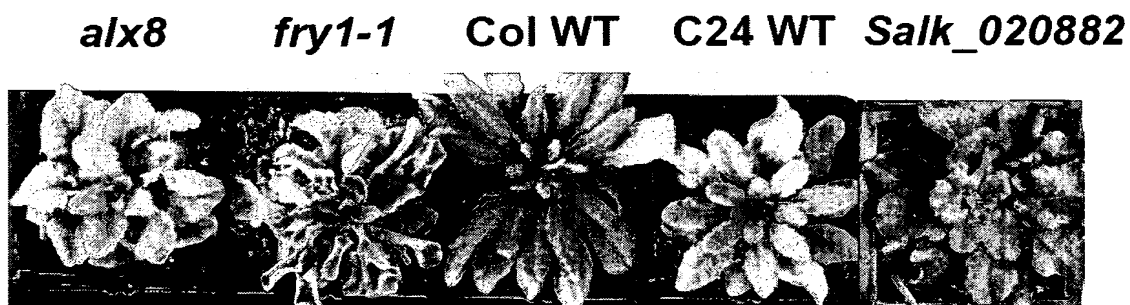


FIGURA 13

Sobrevivência de Plantas à seca sem água

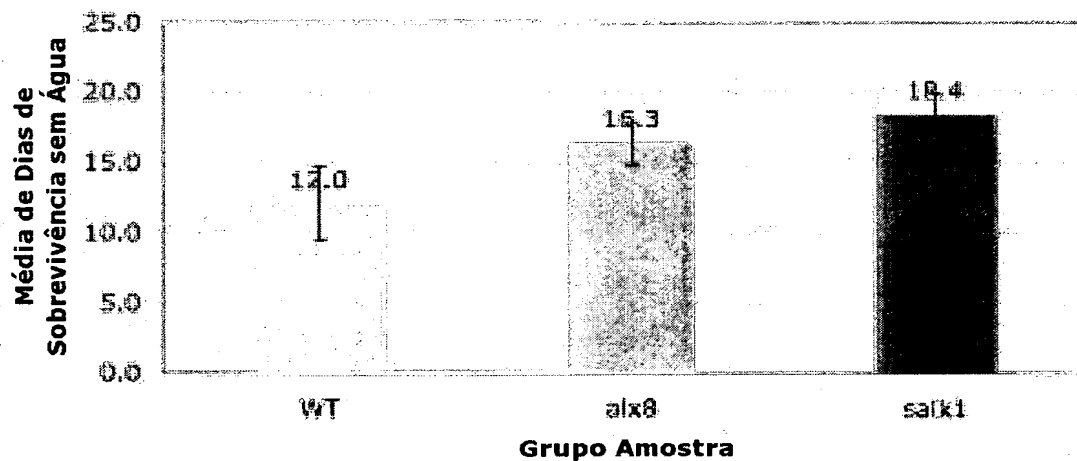


FIGURA 14



FIGURA 15A

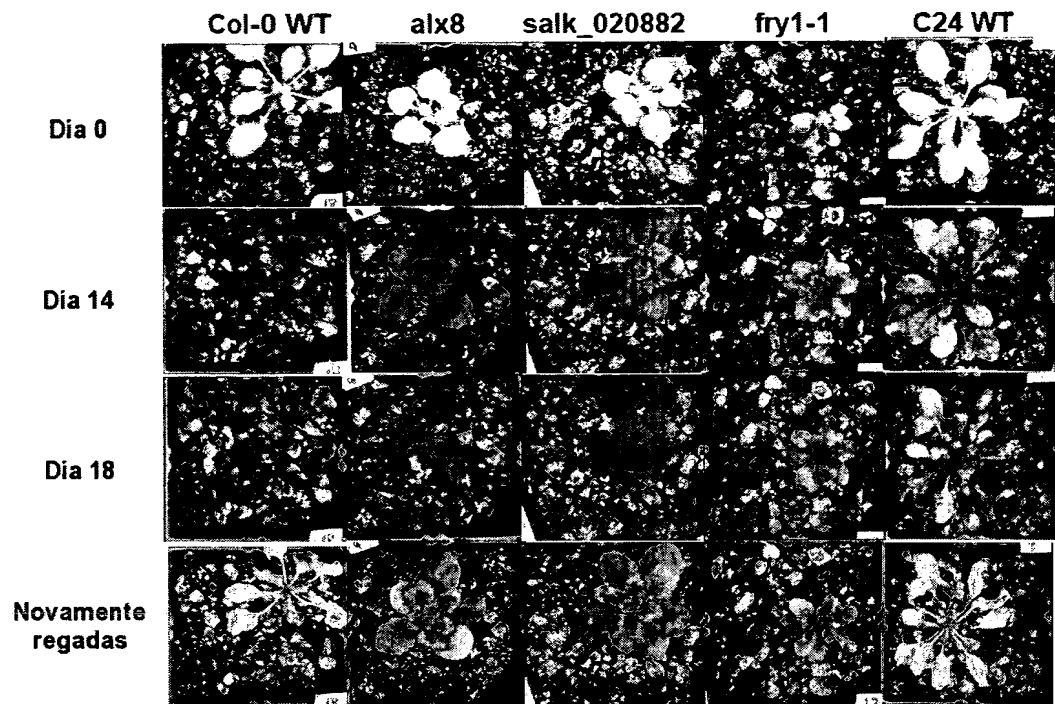


FIGURA 15B

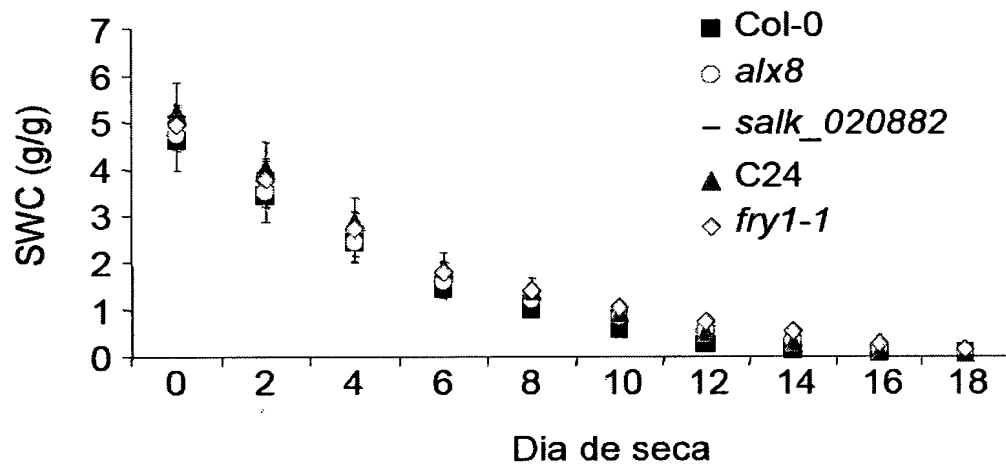


FIGURA 16A

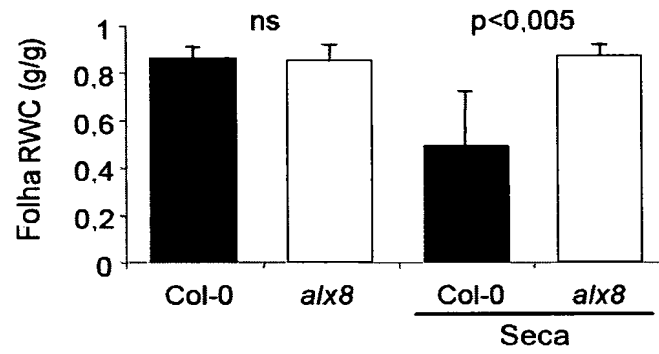


FIGURA 16B

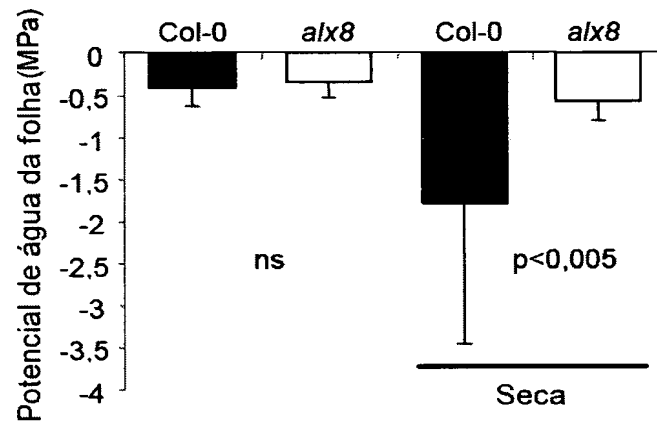


FIGURA 17

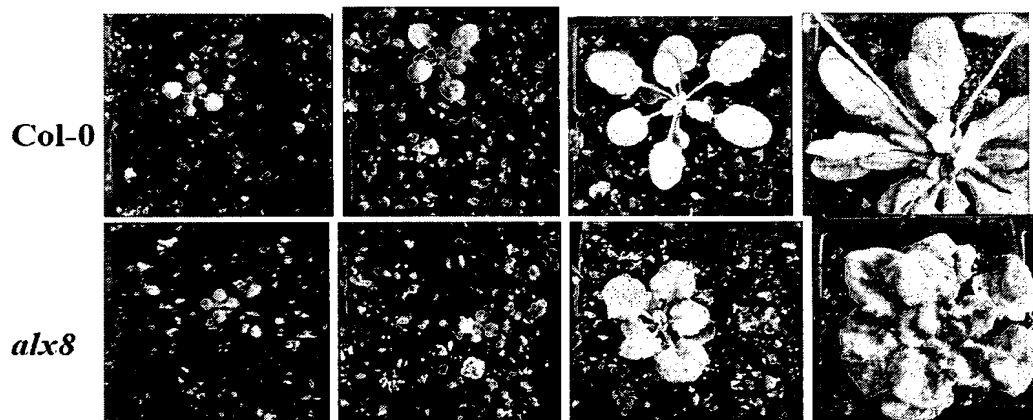
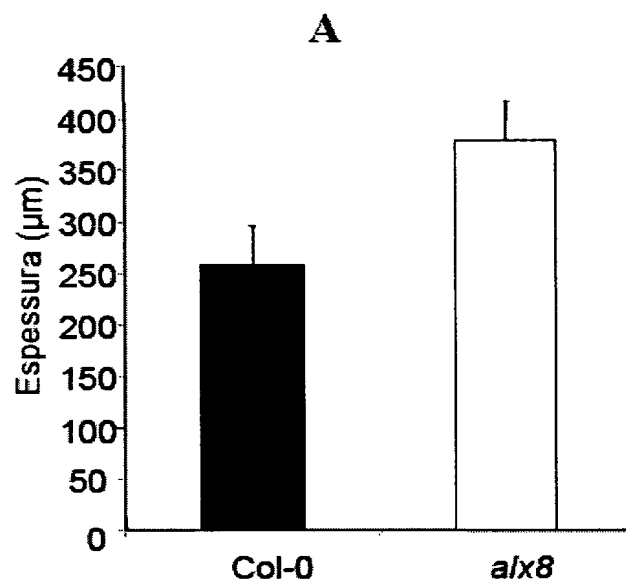
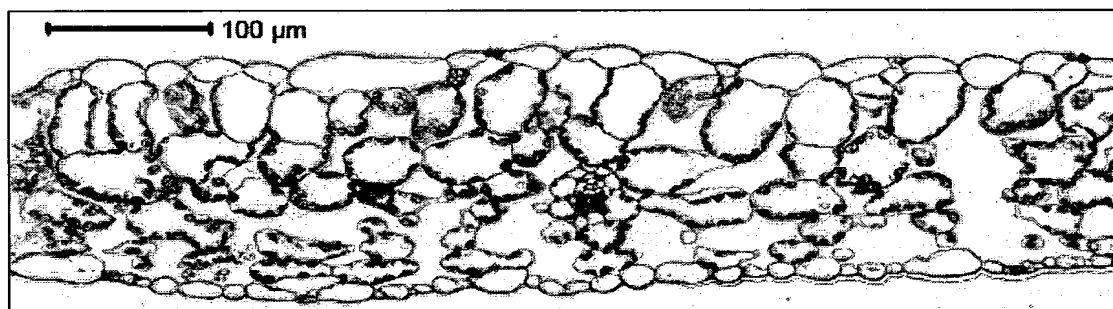


FIGURA 18



B

Col-0



alx8

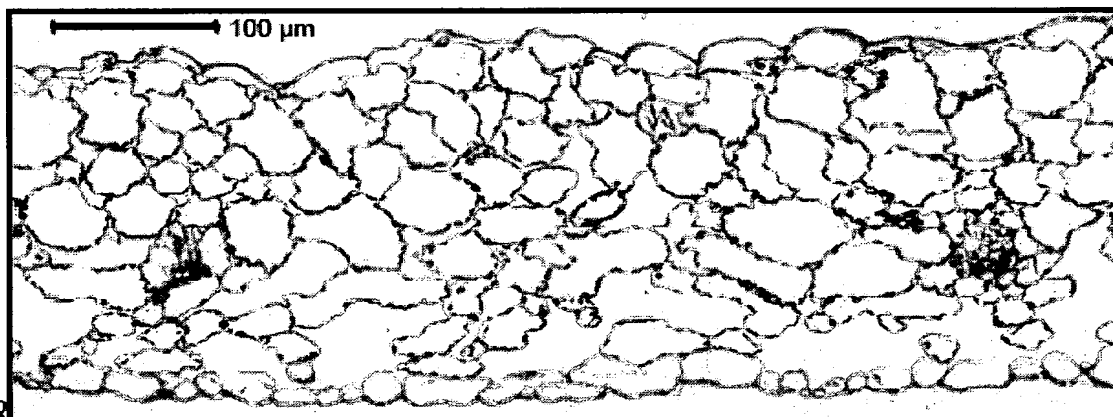


FIGURA 19

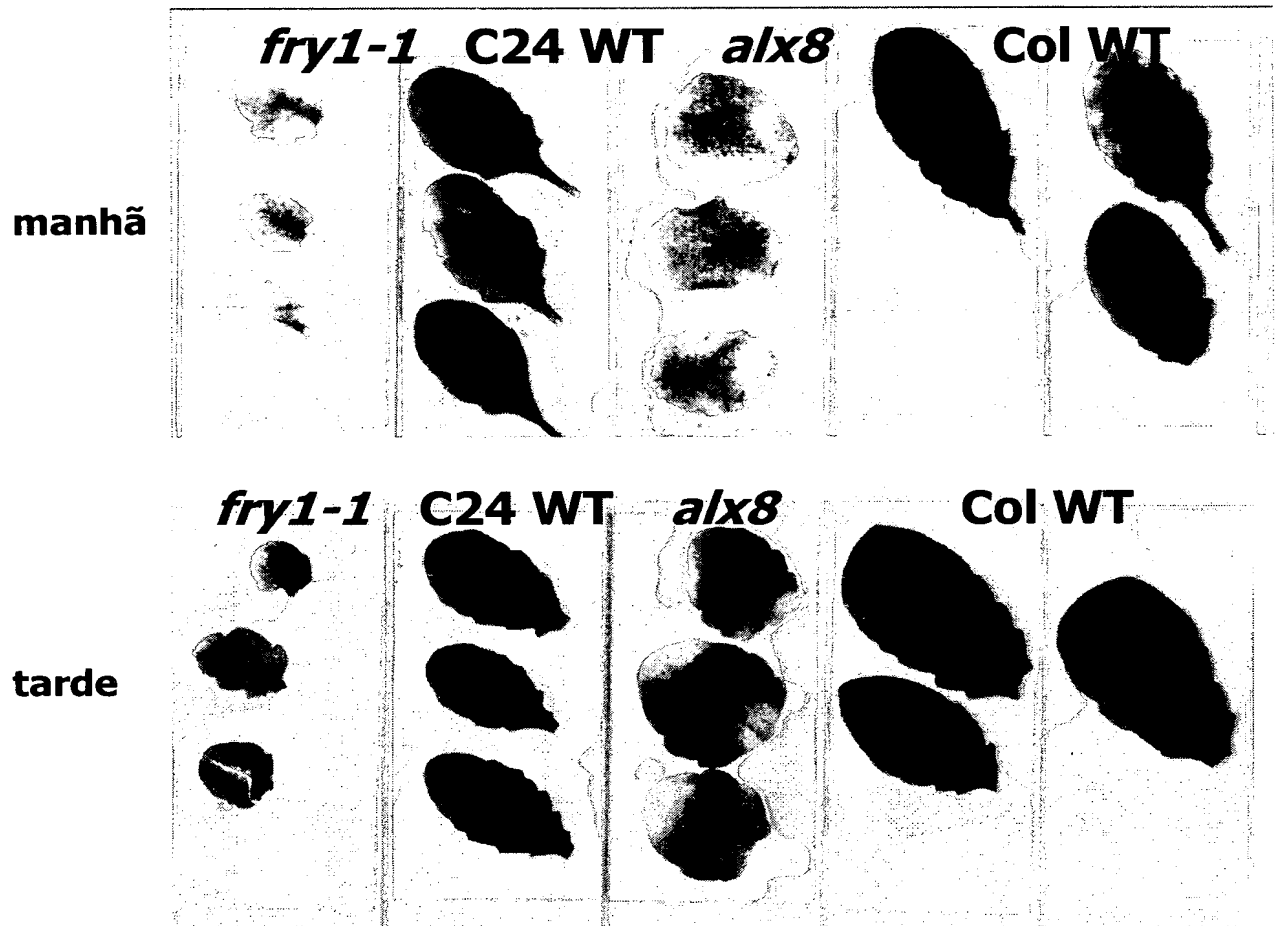


FIGURA 20

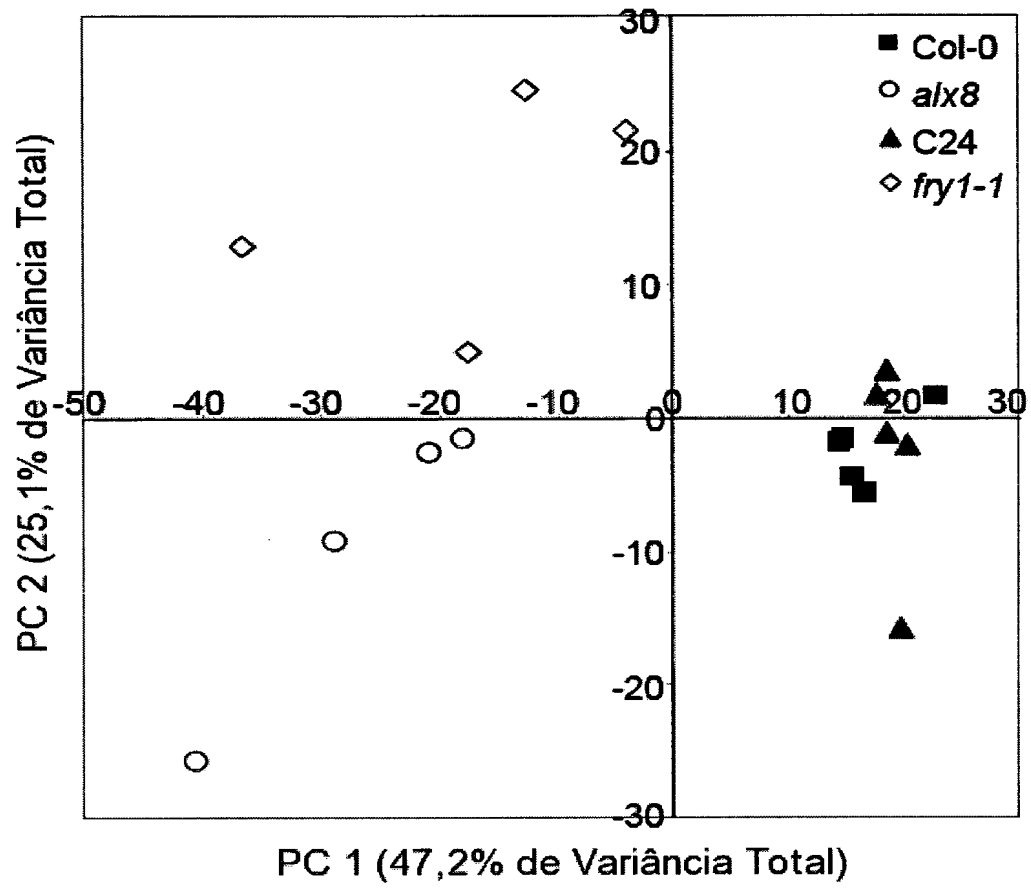
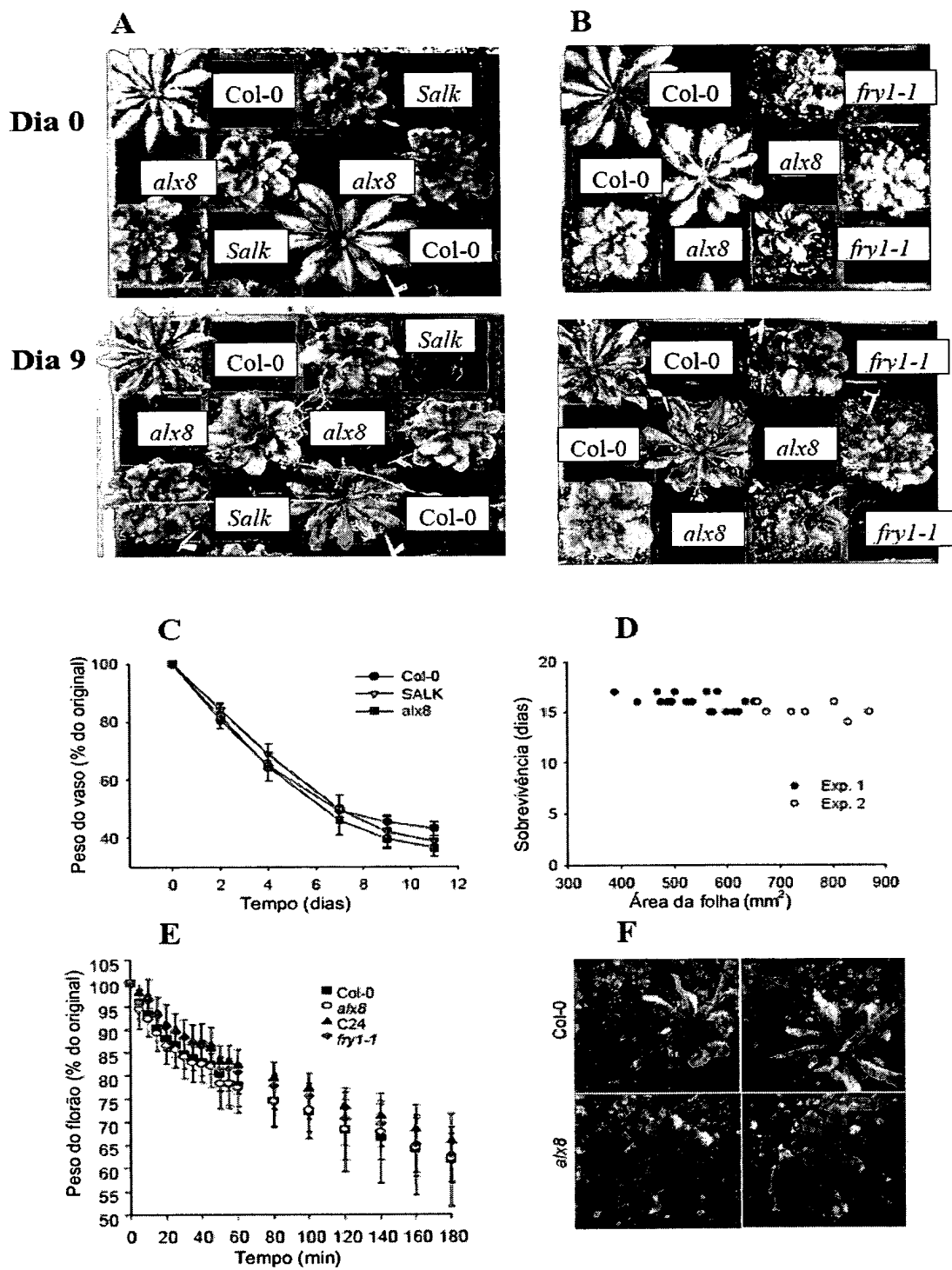


FIGURA 21



RESUMO

MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA COM MAIOR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE, COM TEMPO DE FLORESCIMENTO ALTERADO, COM FENÓTIPO FOLIAR ALTERADO, MÉTODO PARA INVESTIGAR UMA PLANTA, PLANTAS, PARTE DE PLANTA OU SEMENTE MUTANTE OU TRANSGÊNICA,

A presente invenção fornece um método para obtenção de plantas com maior resistência ao estresse, em relação à planta nativa, compreendendo:

- 10 a- Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, resultando em menor atividade associada à SAL1, ou a um homólogo seu, na(s) referida(s) célula(s);
- b- Regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) 15 referida(s) células; e
- c- Seleção de uma ou mais plantas com maior resistência ao estresse, relativamente à planta nativa.

Reivindicações emendadas

REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de uma planta com maior resistência ao estresse, em relação à planta nativa, caracterizado por:

5

(a) Introdução de, pelo menos, uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, resultando em menor atividade associada com SAL 1, ou homólogo seu, na(s) referida(s) célula(s);

10 (b) Regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); e

(c) Seleção de uma ou mais plantas que sejam mais resistentes ao estresse do que a planta nativa.

15 2. O método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das referidas mutações é introduzida por exposição da(s) referida(s) célula(s) a mutagênicos químicos ou físicos ou por métodos de mutação insercional, como transposons ou T-DNA.

20

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das referidas mutações é introduzida por método recombinante.

25

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de introduzir pelo menos uma mutação no gene SAL 1, ou homólogo dele, ou inibir ou suprimir a expressão do gene SAL1 ou de homólogo dele.

30

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de introduzir uma mutação na sequência nucleotídica codificadora de SAL1, ou de homólogo dele, na(s) referida(s) célula(s).

35

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreender a inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos na região dos nucleotídeos 731 a 745, 1226, 1518, 1519 e 1690 da SEQ ID No. 1, ou de posição equivalente, em um homólogo, de pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No. 1.

8. Método de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inclusão de uma mudança de guanina para adenina na posição 1226 da SEQ ID No. 1, ou em posição equivalente, em um homólogo, de pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No. 1.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a mutação resulta em uma mudança de aminoácido, de glicina para ácido aspártico, na posição 217 da SEQ ID No. 2.

10. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inserção de um mais nucleotídeos entre as posições 734 e 735 da SEQ ID No. 1 ou em posição equivalente, em um homólogo, de pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

11. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a substituição dos nucleotídeos 735-745 da SEQ ID No.1, ou nucleotídeos equivalentes, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1, por um ou mais nucleotídeos.

12. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inserção de um ou mais nucleotídeos entre, ou incluindo, as posições 1518 e 1519 da SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que o(s) dito(s) nucleotídeo(s) inserido(s) ou substituído(s) incluem uma inserção de T-DNA.

5 14. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a inclusão de uma mutação de citosina em timina na posição 731 da SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

10 15. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a mudança de guanina por adenina na posição 736 de SEQ ID No.1, ou em posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os
15 nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

16. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação compreende a mudança de guanina em adenina na posição 1690 de SEQ ID No.1, ou em
20 posição equivalente, em um homólogo, a pelo menos os nucleotídeos 191-1991 da SEQ ID No.1.

17. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a referida mutação é uma mutação nula SAL1.

25 18. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender a introdução na(s) referida(s) célula(s), de ácido nucléico exógeno que suprime a expressão da proteína endógena SAL1, ou de homóloga dela.

30 19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido ácido nucléico exógeno possui uma sequência de ácidos nucléicos homóloga ou complementar a, pelo menos, uma porção da sequência codificadora de SAL1 endógena,
35 ou de homólogo dela.

20. Método de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o referido ácido nucléico

exógeno está ligado operacionalmente a promotor indutível de estresse.

21. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo
5 fato de compreender a introdução na(s) referida(s) célula(s) de ácido nucléico exógeno que substitui a expressão da proteína SAL1 endógena, ou de homólogo dela, pela expressão de uma proteína exógena.

10 22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a planta resultante é mais resistente ao estresse por seca, salinidade, temperatura ou luminosidade, ou combinações deles, do que a planta nativa.

15 23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a planta resultante é mais resistente à seca do que planta nativa.

20 24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 23, caracterizado pelo fato de a referida planta foi selecionada entre Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae/Amaranthaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Gramineae, Leguminosae, Poaceae, Rosaceae ou
25 Solanaceae.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida planta é membro da família Brassicaceae.

30 26. Uma planta mais resistente ao estresse do que a planta nativa, caracterizada pelo fato de ser obtida por qualquer método das reivindicações de 1 a 25.

35 27. A planta de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de ser mais resistente ao estresse por seca, salinidade, temperatura ou luminosidade, ou qualquer combinação deles, do que a planta nativa.

28. A planta de acordo com a reivindicação 27 caracterizada por ser mais resistente, pelo menos, à seca do que a planta nativa.

5 29. A planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizada pelo fato de que a referida planta foi selecionada entre as famílias Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae/Amaranthaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Gramineae, Leguminosae, Poaceae, 10 Rosaceae ou Solanaceae.

15 30. A planta de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a referida planta é membro da família Brassicaceae.

31. Método de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que a planta resultante tem florescimento tardio.

20 32. Método para obter uma planta com tempo de florescimento alterado em relação à planta nativa caracterizado por compreender:

25 (a) introdução de pelo menos uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, que resulte em alteração da atividade associada a SAL1, ou homóloga dele, na(s) referida(s) célula(s);

(b) regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); e

30 (c) seleção de uma ou mais plantas que tiveram florescimento alterado em relação à planta nativa.

33. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a mutação ou ácido nucléico exógeno referido resulta em menor atividade associada a SAL1, ou homólogo dele, 35 e de que o referido método resulta em uma planta com tempo de florescimento tardio.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado pelo fato de que o referido atraso no florescimento pode ser de cerca de sete a cerca de cem dias.

5 35. Uma planta com tempo de florescimento alterado em relação à planta nativa, caracterizada pelo fato de ter sido obtida por qualquer um dos métodos das reivindicações 31 a 34.

10 36. Uma planta com atraso no tempo de florescimento em relação à planta nativa, caracterizada pelo fato de ter sido obtida por qualquer um dos métodos das reivindicações 31 a 34.

15 37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de as plantas resultantes possuírem fenótipos foliares alterados.

38. Método para obter uma planta com fenótipo foliar alterado em relação à planta nativa caracterizado por compreender:

20 (a) introdução de pelo menos uma mutação ou ácido nucléico exógeno no genoma de uma ou mais células da planta, que resulte em menor atividade associada a SAL1, ou homóloga dele, na(s) referida(s) célula(s).

25 (b) regeneração de uma ou mais plantas a partir da(s) referida(s) célula(s); e

(c) seleção de uma ou mais plantas com fenótipo foliar alterado em relação à planta nativa.

30 39. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38 caracterizado pelo fato de o referido fenótipo foliar alterado compreende uma folha mais espessa, mais curta, mais arredondada, com extremidades mais lobuladas, ou uma folha com duas ou mais alterações fenotípicas, sendo estas selecionadas entre folhas mais espessas, mais curtas, mais arredondadas e
35 extremidades lobuladas.

40. Uma planta com fenótipo da folha alterado em relação à planta nativa, caracterizada pelo fato de ter sido obtida por qualquer um dos métodos das reivindicações de 37 a 39.

5 41. Parte de planta ou semente mutante ou transgênica, caracterizadas por serem oriundas de uma planta de qualquer uma das reivindicações 26 a 30, 36 ou 40.

10 42. Método para investigar uma planta quanto à maior resistência ao estresse, em relação à planta nativa, caracterizado pelo fato de que o referido método inclui análise do DNA da planta quanto à presença de, pelo menos, um alelo mutante de uma sequência nucleotídica codificadora de SAL1, ou de um homólogo dele, utilizando, pelo menos, uma
15 molécula adequada de ácido nucléico como sonda ou primer, capaz de hibridizar-se a um gene SAL1, ou homólogo dele, em condições severas.

(c) seleção de uma ou mais plantas com fenótipo foliar
20 alterado em relação à planta nativa.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de usar pelo menos um par de primers de oligonucleotídeos adequado para amplificar uma região do gene
25 SAL1, ou de homólogo dele, em que o par de primers possui um primer direto e um reverso para detectar a presença, ou ausência, de mutação na região referida.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado
30 pelo fato de que a referida região inclui o gene SAL1 completo, ou homólogo dele.

45. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a referida região inclui uma porção do gene
35 SAL1, ou de homólogo dele.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a referida região inclui exon 3, o íntron entre os exons 3 e 4, éxon 5, o íntron entre os exons 5 e 6, exon 6, e o íntron entre os exons 6 e 7, ou qualquer
5 combinação desses.