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

(11) PI 0618965-2 B1

(22) Data do Depósito: 24/10/2006

(45) Data de Concessão: 12/01/2021

(54) Título: MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UMA CONDIÇÃO DE ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA, MÉTODO PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DO USO DE FERTILIZANTE E/OU ABSORÇÃO DE UMA PLANTA

(51) Int.Cl.: A01H 1/00; C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 24/10/2005 US 60/729,181.

(73) Titular(es): EVOGENE LTD.

(72) Inventor(es): RODRIGO YELIN; AVI SHOSHAN; EVGENIA GOLD; SHARON AYAL; HAGAI KARCHI.

(86) Pedido PCT: PCT IL2006001223 de 24/10/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/049275 de 03/05/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/04/2008

(57) Resumo: CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO, POLIPEPTÍDEO ISOLADO COMPREENDENDO UMA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDO, CÉLULA DE PLANTA COMPREENDENDO UM POLINUCLEOTÍDEO EXÓGENO, MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UMA CONDIÇÃO DE ESTRESSE, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA, MÉTODO PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DO USO DE FERTILIZANTE E/OU ABSORÇÃO DE UMA PLANTA E CÉLULA DE PLANTA, sendo que as construções de ácido nucléico são fornecidas; essas construções compreendendo quaisquer das seqüências de ácido nucléico pelo menos 85% idênticas às seqüências de nucleotídeos selecionadas a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 68, 1, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 37, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 64, 69, 70, 73, 77, 78, 79, 80, 94, 86, 87, 93, 94, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 e 109 e uma seqüência de promotor capaz de instruir a transcrição da referida seqüência de ácido nucléico em uma célula hospedeira; da mesma forma, são fornecidas plantas transgênicas que expressam essas construções de ácido nucléico e métodos para utilizar as mesmas.

MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UMA CONDIÇÃO DE ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA, MÉTODO PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DO USO DE FERTILIZANTE E/OU ABSORÇÃO DE UMA PLANTA

CAMPO E HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos polipeptídios isolados, polinucleotídeos codificando os mesmos, plantas transgênicas expressando os mesmos e métodos para utilizar os mesmos. Especificamente, a presente invenção pode ser usada para aumentar a eficiência do uso de fertilizante e resistência ao estresse, bem como biomassa, vigor e produção de plantas transgênicas.

Os fertilizantes são o combustível por trás da "revolução verde", diretamente responsáveis pelo amento excepcional nos rendimentos de safra durante os últimos 40 anos. O aumento dramático nos rendimentos de safra nunca poderia ter ocorrido sem um aumento paralelo no uso de fertilizante. Entretanto, nos anos recentes, houve uma preocupação crescente com o impacto ambiental do uso de fertilizante, especificamente os fertilizantes de nitrogênio, na poluição atmosférica e de água. Os limites sobre o uso de fertilizante foram legislados em diversos países, e restrições adicionais são esperadas no futuro. O maior uso de fertilizantes será

23

necessário no futuro para suportar a produção de alimento e fibra para o rápido crescimento de população sobre recursos limitados de terra.

O fertilizante é freqüentemente mencionado como a despesa geral número um na agricultura. Dos três macronutrientes fornecidos como principais fertilizantes [Nitrogênio (N), Fosfato (P) e Potássio (K)], o nitrogênio é o único que normalmente necessita ser reabastecido a cada ano, especificamente para grãos, que compreendem mais do que metade das áreas cultivadas no mundo.

Uma abordagem comum para promover o crescimento de planta foi, e continua sendo, o uso de nutrientes (fertilizantes), natural bem como sintético. Os nutrientes sintéticos normalmente fornecem um macronutriente em uma forma utilizável da planta, tal como, uréia, por exemplo, e/ou nitratos inorgânicos, fosfatos ou compostos semelhantes. Enquanto tais nutrientes poderão ser aplicados, mais ou menos, por conveniência do fazendeiro, e poderão ser aplicados na freqüência considerada desejável, a utilização em excesso dos nutrientes sintéticos e o uso ineficiente dos nutrientes sintéticos são fatores principais responsáveis pelos problemas ambientais, tais como, eutroficação do lençol de água, poluição por nitrato, poluição por fosfato e semelhantes.

O nitrogênio é um macronutriente essencial para a planta, responsável pela biossíntese dos aminoácidos e ácidos nucléicos, grupos

protéticos, hormônios de planta, defesas químicas da planta, etc. O nitrogênio é freqüentemente o elemento limitante de taxa no crescimento da planta e todas as safras em campo possuem uma dependência fundamental no fertilizante nitrogenado inorgânico.

Considerando que o fertilizante é rapidamente esgotado da maioria dos tipos de solo, ele deve ser fornecido às safras crescentes duas ou três vezes durante a temporada de crescimento. O fertilizante nitrogenado, que é normalmente fornecido como nitrato de amônia, nitrato de potássio ou uréia, tipicamente contabiliza 40% dos custos associados com as safras, tais como milho e trigo. Foi estimado que até 2050, mais de 150 milhões de toneladas de fertilizante nitrogenado serão utilizados no mundo anualmente. A eficiência aumentada do uso do nitrogênio pelas plantas deve permitir que as safras sejam cultivadas com menor entrada de fertilizante, ou alternativamente nos solos de qualidade inferior e, portanto, teria impacto econômico significativo nos sistemas agrícolas desenvolvidos e em desenvolvimento. Uma visão geral dos efeitos indesejáveis do fertilizante de nitrogênio é apresentada por Byrnes, Fertilizer Research, 26, pp. 209-215 (1990). Embora as plantas sejam capazes de obter o nitrogênio orgânico do ambiente, a parte principal do nitrogênio utilizado é proveniente da captação do nitrogênio inorgânico na forma de amônia (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) e sua conversão posterior ao nitrogênio orgânico em um processo conhecido como assimilação.

O processo de assimilação do nitrogênio tem início com o NO_3^- sendo convertido para NH_4^+ seqüencialmente pelas enzimas Reductase de Nitrato (NR) e Reductase de Nitrito (NiR). O nitrogênio é então incorporado em Glutamato (Glu) pela Sintase de Glumamina (GS) para obter a Glutamina (Gln). A via principal da assimilação de nitrogênio é o ciclo GS/GOGAT (Sintase de Transferase de Amina Glumamina/Glutamato-Oxoglutarato).

Os aminoácidos restantes são sintetizados de Gln, Glu e Asn por transaminação.

O nitrogênio (como aminoácidos ou na forma de nitratos) é deslocado ao broto, em que é armazenado nas folhas e talo durante a etapa rápida do desenvolvimento de planta e até a floração. No milho, por exemplo, as plantas acumulam-se o volume de seu nitrogênio orgânico durante o período da germinação de grão, e até a floração. Assim que a fertilização da planta ocorrer, os grãos começam a se formar e tornam-se o escoadouro principal do Nitrogênio da planta. O Nitrogênio armazenado pode ser então redistribuído a partir das folhas e talo que servem como compartimentos de armazenamento até a formação de grão.

Esses são os três parâmetros principais da eficiência usada para definir o metabolismo de Nitrogênio da planta:

Eficiência de captação do Nitrogênio: é a quantia de N na biomassa acima do solo (gr Nt) dividida pela quantidade de N aplicada (gr/hectare);

Eficiência de utilização do

Nitrogênio: é a Produção de Grão (gr/planta) dividida pela quantidade de N na biomassa acima do solo (gr Nt); e

Eficiência de uso do Nitrogênio: é a Produção de Grão (gr/planta) dividida pela quantidade de N aplicado (gr/Ha).

A eficiência de captação do Nitrogênio [a quantidade do N da biomassa acima do solo (gr Nt) / N aplicado (gr/hectare)] é a quantidade total do nitrogênio incorporado pela planta e é uma função da "captação" (a capacidade de transporte da planta), a eficiência metabólica do processo de assimilação e a taxa do desenvolvimento de tamanho da planta, considerando que a massa do talo e folhas criada durante o crescimento são os órgãos de armazenamento do Nitrogênio efetivos. A fração do Nitrogênio assimilado encontrada em um broto que é finalmente transferido ao grão (produção) é controlada de forma enzimática, e assim um local potencial para manipulação transgênica. Esse parâmetro é, em efeito, igual à eficiência de Utilização do Nitrogênio (NUE). O melhor particionamento N de grão para broto mais provavelmente melhorará o rendimento e teor de proteína do grão.

De forma semelhante, os mesmos cálculos das eficiências de uso e utilização podem ser feitos para outros macronutrientes, tais como Fósforo (P) e Potássio (K), que possuem uma correlação direta com a produção e tolerância geral da planta.

A NUE para as safras principais varia de 30-70% apenas, com um impacto negativo direto sobre

as despesas de entrada para o fazendeiro, devido ao excesso de fertilizante aplicado, que rapidamente se torna um peso ecológico. Dessa forma, os resíduos contendo nitrato representam um problema ambiental de significância global. A infiltração de Nitrato na água provoca eutroficação de lagos, rios e mares (as águas arriscadas devido ao crescimento das algas que conduz à hipoxia e destruição da fauna marinha). A contaminação de Nitrato na água potável pode provocar metemoglobinemia, que é especialmente prejudicial aos infantes e mães lactentes. De fato, a Indústria Agrícola é considerada como a maior poluidora de nitrato de superfície e águas costeiras e abastecimentos de água potável.

A melhoria genética da Eficiência do uso de fertilizante (FUE) em plantas pode ser gerada via procriação tradicional ou via engenharia genética. Entretanto, até a data, nem os produtos transgênicos nem o material de FUE melhorado classicamente procriado foram liberados para uso comercial. Entre os motivos para isso, o mais importante é que os procriadores selecionam suas linhas de elite sob as condições mais favoráveis de fertilizante, assim supervisionando as melhorias na FUE (produção sendo o acionador principal das vendas e não redução nos custos de entrada). As tentativas nas soluções transgênicas para FUE melhorada estão sendo realizadas pelas empresas, tais como, Monsanto (vide, por exemplo, os Pedidos de Patente Norte-Americana 20020046419 para Choo, et al.; Pedido de Patente Norte-Americana

2005010879 para Edgerton et al.; e Pedido de Patente Norte-Americana 2006 0179511 para Chomet et al), Arcadia Biosciences e Biogemma.

Recentemente, uma revisão resumindo as tentativas para melhorar a FUE através meios transgênicos que foram empreendidas pelos laboratórios acadêmicos foi publicada (Good AG et al. Trends Plant Sci. 2004 Dec;9(12):597-605). Os resultados encorajadores foram relatados por Yanagisawa e co-trabalhadores (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 May 18;101(20):7833-8) que averiguaram que um aumento geneticamente de engenharia no crescimento sustentado na produção de esqueleto de carbono (2-Oxoglutarato, OG do ciclo GS/GOGAT) da Arabidopsis transgênica sob condições baixas de nitrogênio. Conforme muitas enzimas estão envolvidas na produção do esqueleto de carbono, o transgene era um fator chave de transcrição (Dof1) que ativou genes múltiplos envolvidos na via. O teor de Nitrogênio era superior nas plantas transgênicas Arabidopsis por aproximadamente 30 % sob baixas condições de nitrogênio. A Patente Norte-Americana N° 6.084.153 para Good et al. revela o uso de um promotor responsivo ao estresse para controlar a expressão da Alanina Amina Transferase (AlaAT). Good et al. ainda revela que as plantas transgênicas de canola melhoraram a tolerância da deficiência de nitrogênio e seca quando comparado às plantas de controle. Entretanto, nem as construções de Dof1 de Yanagisawa et al, nem as construções de AlaAT induzida por seca de Good et al. foram avaliadas nas linhas comerciais,

sob as verdadeiras condições em campo. Assim, a relevância econômica dos resultados ainda deve ser comprovada.

Dessa forma, existe uma necessidade amplamente reconhecida, e seria altamente vantajoso identificar os polinucleotídeos e polipeptídios que melhoram a eficiência de captação/uso de fertilizante nas plantas transgênicas expressando os mesmos, que são destituídos das limitações acima.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecida uma construção de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de ácido nucléico pelo menos 85 % idêntica a uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°: 68, 1, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 37, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 64, 69, 70, 73, 77, 78, 79, 80, 84, 86, 87, 93, 94, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 e 109 e uma seqüência de promotor capaz de instruir a transcrição da seqüência de ácido nucléico em uma célula hospedeira.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a seqüência de ácido nucléico é conforme estabelecida na SEQ ID N°: 68, 1, 4, 5, 8, 9,11,13,16, 19, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 37, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 64, 69, 70, 73, 77, 78, 79, 80, 84, 86, 87, 93, 94, 98, 101, 102, 103, 104,105, 106, 107, 108, 109, 219-767, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327,1328,

1329,1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335 ou 1336.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um polipeptídio isolado, compreendendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 85 % homóloga à seqüência de aminoácido estabelecida na SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217 ou 218.

De acordo ainda com outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma célula de planta compreendendo um polinucleotídeo exógeno que compreende uma seqüência de ácido nucléico codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 85 % homóloga à SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217 ou 218.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a célula de planta forma uma parte de uma planta.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a seqüência de aminoácido é conforme estabelecida na SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163,

164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 768-1051, 1053-1098, 1100-1315 ou 1316.

De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a tolerância de uma planta a uma condição de estresse, compreendendo a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 85 % homóloga à SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 1341 ou 1343, assim aumentando a tolerância da planta às condição de estresse.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a biomassa, vigor e/ou produção de uma planta, compreendendo a expressão dentro da planta um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 85 % homóloga à SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 1341 ou 1343, assim aumentando a biomassa, vigor e/ou produção da planta.

De acordo com ainda um aspecto

adicional da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a eficiência do uso de fertilizante e/ou captação de uma planta compreendendo a expressão dentro da planta um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 85 % homóloga à SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 1341 ou 1343, assim aumentando a eficiência do uso de fertilizante e/ou captação da planta.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a expressão é efetuada por:

(a) transformar uma célula da planta com o polinucleotídeo exógeno;

(b) gerar uma planta madura a partir da célula; e

(c) cultivar a planta madura sob condições adequadas para expressar o polinucleotídeo exógeno dentro da planta madura.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a transformação é efetuada pela introdução na célula de planta uma construção de ácido nucléico incluindo o polinucleotídeo exógeno e pelo menos um promotor capaz de instruir a transcrição do polinucleotídeo exógeno na célula de planta.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, pelo menos um promotor é um promotor constitutivo.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas da invenção abaixo descrita, o promotor é um promotor constitutivo.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o promotor constitutivo é o promotor CaMV 35S.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o promotor é um promotor induzível.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o promotor induzível é um promotor induzível de estresse abiótico.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o promotor é um promotor específico de tecido.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o tecido é um tecido raiz.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a célula hospedeira é uma célula de planta.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a célula de planta forma uma parte de uma célula de planta dicotiledônea.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a célula

de planta forma uma parte de uma célula de planta monodicotiledônea.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a condição de estresse é um estresse abiótico.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o estresse abiótico é selecionado a partir do grupo consistindo na salinidade, seca, baixa temperatura, alta temperatura, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, osmótico e deficiência de nutriente.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o nutriente é o nitrogênio.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a planta é uma planta dicotiledônea.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a planta é uma planta monodicotiledônea.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o polinucleotídio compreende uma seqüência de ácido nucléico selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°: 68, 1, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 37, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 64, 69, 70, 73, 77, 78, 79, 80, 84, 86, 87, 93, 94, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108,109, 219-767, 1317, 1318, 1319, 1320,

1321,1322, 1323,1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1340 ou 1342.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a seqüência de aminoácido é conforme estabelecida na SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 768-1051, 1053-1098, 1100-1316, 1341 ou 1343.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, as condições são as condições de estresse abiótico.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, as condições são as condições de deficiência de fertilizante.

De acordo com ainda um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método para irrigação compreendendo:

(a) colocação em um solo um sistema de irrigação por gotejamento de modo a obter os orifícios de irrigação distribuídos 20-40 cm entre si nas direções X e Y; e

(b) irrigação contínua através de cada um dos referidos orifícios de irrigação em uma taxa de irrigação de 0,5-2 litros de água por hora.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um sistema de irrigação para imitar as condições de seca, compreendendo:

(i) um sistema de irrigação por gotejamento com orifícios de irrigação distribuídos 20-40 cm entre si nas direções X e Y; e

(ii) um sistema de controle e abastecimento de água para continuamente irrigar através de cada um dos referidos orifícios de irrigação 0,5-2 litros de água por hora.

A presente invenção trata de modo bem-sucedido as falhas das configurações atualmente conhecidas ao fornecer os polinucleotídios e polipeptídios que melhoram a eficiência do uso de fertilizante/captação nas plantas transgênicas expressando os mesmos.

Exceto se de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem o mesmo significado conforme comumente entendidos por aquele com habilidade na técnica a quem esta invenção pertence. Embora os métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos no presente possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais adequados são abaixo descritos. No caso de conflito, a especificação de patente, incluindo definições, controlará. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não têm a intenção de serem limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção é neste ato descrita, somente como exemplo, com referência aos desenhos anexos. Com referência específica agora aos desejos em detalhes, é enfatizado que os detalhes mostrados são como

exemplo e somente para fins de discussão ilustrativa das configurações preferidas da presente invenção, e são apresentados para fornecer o que é acreditado como sendo a descrição mais útil e prontamente entendida dos princípios e aspectos conceituais da invenção. Com relação a isso, nenhuma tentativa é feita para mostrar os detalhes estruturais da invenção em mais detalhes do que sejam necessários para um entendimento fundamental da invenção, a descrição considerada com os desenhos tornando aparente para aqueles com habilidade na técnica como as diversas formas da invenção podem ser configuradas na prática.

Nos desenhos:

a figura 1A é uma ilustração esquemática descrevendo o desenvolvimento do sistema de raiz da planta na seca. A umidade escassa do solo induz a formação de um sistema de raiz mais profundo. O desenho é adaptado de Weaver [Root Development of Field Crops. McGraw Hill Inc., New York, 291 p. (1926)];

a figura 1B é uma representação esquemática das estratégias biológicas escolhidas para melhorar o traço de NUE e a tradução das estratégias para as questões realizadas durante a mineração de dados computacionais;

as figuras 2A-D mostram a expressão digital de FUE_1;

as figuras 3A-D são gráficos demonstrando a expressão dos genes de controle (transportadores de Nitrogênio e sintase de Glutamina) como uma

função do teor de nitrogênio no solo. As plantas foram cultivadas em vasos de litro com concentrações crescentes de NH_4NO_3 (em 0,005, 0,05, 0,5 e 5 mM) ou KNO_3 (em 0,01, 0,1, 1 ou 5 mM). As plantas foram cultivadas por aproximadamente 30 dias e os tecidos foram rompidos congelados em nitrogênio líquido. O RNA foi extraído dos tecidos e posteriormente tratado com DNAse. O RNA foi transcrito de forma reversa e usado para ensaios de quantificação usando PCR de Tempo Real. Para normalização, a expressão em cada ponto foi dividida pela média geométrica da expressão de quatro rotinas, conforme descrito no Exemplo 2. Os resultados mostrados são a proporção entre a expressão normalizada e os níveis de expressão medidos na concentração mais alta verificada (5mM NH_4NO_3 ou 5 mM KNO_3);

as figuras 4A-K são gráficos mostrando a expressão correlacionada da seqüências de polinucleotídio da presente invenção com a disponibilidade do nitrogênio.;

as figuras 5A-E são gráficos mostrando a expressão correlacionada inversamente da seqüências de polinucleotídio da presente invenção com a disponibilidade do nitrogênio;

a figura 6 é uma representação gradual esquemática da tecnologia usada para a quantificação da área

de roseta da planta a partir das imagens digitais. A etapa de processamento filtra as partes verdes das plantas individuais. Após a designação de ROIs individuais (Região de Interesse), a área coberta pela área de roseta é calculada e exportada a uma planilha;

as figuras 7A-B são fotografias mostrando a capacidade dos polinucleotídios da presente invenção de aumentar a eficiência do uso de nitrogênio. A Figura 7A de plantas T1 - transgênicas expressando FUE_504 (SEQ ID N°: 108) de acordo com o promotor TT105. A Figura 7B, um evento transgênico representativo expressando FUE_43 (SEQ ID N°: 70) de acordo com o promotor 35S. As plantas foram cultivadas em condições de nitrogênio muito limitantes (0,05 e 0,2 mM de nitrogênio inorgânico combinado). As plantas de controle (expressando um gene repórter sob o mesmo promotor ou plantas não transgênicas) foram tratadas de forma semelhante. As diferenças notórias no tamanho de plantinha são traduzidas em diferenças significativas no peso fresco medido das plantinhas;

a figura 8 é uma fotografia mostrando as plantas transgênicas a partir de três eventos transgênicos independentes expressando FUE_34_Evo (SEQ ID N°: 54). A planta mostra ramificação impressiva em cada nó conforme

determinado por um ensaio triplo cego. O sistema de raiz a partir das plantas também foi altamente ramificado e compacto (não mostrado);

a figura 9 mostra cinco eventos transgênicos independentes das plantas expressando FUE_40 (também denominado FUE6/40, SEQ ID N°: 11). Fica claramente notável que o tronco de floração é raramente perpendicular e rígido. Além disso, um número raramente alto de síliquas pode ser contado. Como resultado, as plantas transgênicas expressando FUE_40 são notavelmente prolíficas; e

a figura 10 é um esquema de um sistema de irrigação em conformidade com os ensinamentos da presente invenção.

DESCRIÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES PREFERIDAS

A presente invenção é de polipeptídios isolados, polinucleotídios codificando os mesmos, plantas transgênicas expressando os mesmos e métodos para usar os mesmos. Especificamente, a presente invenção pode ser usada para aumentar a eficiência do uso de fertilizante e resistência ao estresse, bem como, a biomassa, vigor e rendimento das plantas transgênicas.

Os princípios e a operação da presente invenção podem ser melhor entendidos com referência aos desenhos e descrições anexas.

Antes de explicar pelo menos

uma configuração da invenção em detalhe, deve ser entendido que a invenção não é limitada em sua aplicação aos detalhes estabelecidos na seguinte descrição ou exemplificados pelos Exemplos. A invenção é capaz de outras configurações ou de ser praticada ou realizada em diversos modos. Da mesma forma, deve ser entendido que a fraseologia e terminologia aqui utilizados são para fins de descrição e não devem ser considerados como limitantes.

Conforme o custo do fertilizante de Nitrogênio (N) aumenta e o lucro da produção de plantas de safra é colocado como risco, os cientistas são desafiados a desenvolver estratégias que melhoram a eficiência do uso de N (NUE). Dessa forma, os resultados da fertilização escassa ou em excesso resultam em uma perda de lucro. As taxas mais baixas de N aplicado resultam na biomassa reduzida, conforme pode ser comprovado pelo broto reduzido, tamanho, enchimento deficiente de grão, rendimentos reduzidos e baixo teor de aminoácido e proteína. Alternativamente, a aplicação em excesso do nitrogênio pode resultar em rendimento reduzido, custo superior de entrada e risco aumentado ao ambiente.

Ao reduzir a presente invenção para prática, os presentes inventores revelaram através de análises bioinformáticas laboriosas e experimentação, seqüências de polinucleotídio e polipeptídios codificados a partir dos mesmos que pode ser usada para gerar as plantas transgênicas com eficiência melhorada do uso de fertilizante, tolerância ao estresse, valor nutricional

(p.ex., teor de aminoácidos e proteína), biomassa, rendimento e/ou vigor.

Conforme ilustrado abaixo e na seção de exemplos que segue, a seqüências de polinucleotídio do milho foi selecionada com base em diversos critérios (vide Exemplo 1 da seção Exemplos que segue). Isso incluía altos níveis de expressão digital calculada nas pontas de raiz, especialmente nas raízes estressadas de água (p.ex., seca). Um filtro secundário para a seqüências de polinucleotídio acima era com base na expressão digital de suas seqüências ortólogas (i.e., plantas dicotiledôneas ou outras espécies monocotiledôneas). Os genes ortólogos mostrando expressão digital semelhante que os genes de milho (p.ex., oscilações de raiz das plantas tratadas por estresse expostas) foram selecionados.

A mineração de dados e as ferramentas de anotação foram usadas para filtrar os genes que podem ter efeitos amplos no metabolismo de célula. Por exemplo, os genes que podem modificar a arquitetura de raiz, aumentar a capacidade de armazenamento do nitrogênio, melhorar o processo de assimilação do nitrogênio e otimizar o traço de permanência do verde, foram selecionados. Tais genes foram finalmente selecionados para validação molecular (vide Exemplos 3 e 9). Uma representação esquemática dos filtros computacionais aplicados para identificar a seqüências de polinucleotídio da presente invenção é apresentada na Figura 1B e é somente fornecida para ilustração.

As seqüências assim identificadas foram experimentalmente validadas. Conforme mostrado nos Exemplos 6-11, as plantas transgênicas expressando as seqüências de ácido nucléico da presente invenção foram mostradas como ter eficiência aumentada de uso de fertilizante/captação, tolerância ao estresse abiótico, biomassa e produção. Esses resultados fortemente suportam a robustez da metodologia da presente invenção e substanciam o uso desses genes na agricultura.

Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecida uma construção de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de ácido nucléico pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 81 %, pelo menos cerca de 82 %, pelo menos cerca de 83 %, pelo menos cerca de 84 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 86 %, pelo menos cerca de 87 %, pelo menos cerca de 88 %, pelo menos cerca de 89 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 91 %, pelo menos cerca de 92 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, pelo menos cerca de 99 %, ou mais, isto é, 100 % idêntica a uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°: 68, 1, 4, 5, 8, 9, 11,13, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 37, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 64, 69, 70, 73, 77, 78, 79, 80, 84, 86, 87, 93, 94, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 1340 e 1342.

As seqüências de ácido nucléico podem codificar as seqüências de polipeptídio compreendendo uma seqüência de aminoácido pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 81 %, pelo menos cerca de 82 %, pelo menos cerca de 83 %, pelo menos cerca de 84 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 86 %, pelo menos cerca de 87 %, pelo menos cerca de 88 %, pelo menos cerca de 89 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 91 %, pelo menos cerca de 92 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, pelo menos cerca de 99 %, ou mais, isto é, 100 % homóloga à SEQ ID N° 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 1341 ou 1343.

A homologia (p.ex., homologia de por cento) pode ser determinada usando qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, o software BlastP do Centro Nacional das Informações de Biotecnologia (NCBI), tal como, através de usar parâmetros padrão.

A identidade (p.ex., homologia de por cento) pode ser determinada usando qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, o software BlastN do Centro Nacional das Informações de

Biotecnologia (NCBI) tal como, através de usar parâmetros padrão.

De acordo com uma configuração preferida deste aspecto da presente invenção, o polinucleotídio isolado é conforme estabelecido na SEQ ID N°: 68, 1, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 37, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 64, 69, 70, 73, 77, 78, 79, 80, 84, 86, 87, 93, 94, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 219-767, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335 ou 1336.

A seqüência de ácido nucléico (também denominada como polinucleotídio isolado) da presente invenção refere-se a uma única ou de filamento duplo de seqüência de ácido nucléico, que é isolada e fornecida na forma de uma seqüência de RNA, uma seqüência de polinucleotídeo complementar (cDNA), uma seqüência de polinucleotídeo genômica e/ou uma seqüências de polinucleotídio composta (p.ex., uma combinação do acima).

Conforme usado no presente, a frase "seqüência de polinucleotídeo complementar" refere-se a uma seqüência, que resulta da transcrição reversa do RNA mensageiro usando uma transcriptase reversa ou qualquer outra polimerase de DNA dependente de RNA. Tal seqüência pode ser subseqüentemente amplificada in vivo ou in vitro usando uma polimerase de DNA dependente de DNA.

Conforme aqui utilizado, a frase "seqüência de polinucleotídeo genômica" refere-se a

uma seqüência derivada (isolada) a partir de um cromossomo e, assim, representa uma porção contígua de um cromossomo.

Conforme aqui utilizado, a frase "seqüência de polinucleotídeo composta" refere-se a uma seqüência, que é pelo menos parcialmente complementar e pelo menos parcialmente genômica. Uma seqüência composta pode incluir algumas seqüências de exon exigidas para codificar o polipeptídio da presente invenção, bem como algumas seqüências intrônicas interpondo-se ente elas. As seqüências intrônicas podem ser de qualquer fonte, incluindo de outros genes e tipicamente incluirão as seqüências de sinal de entrançamento conservadas. Tais seqüências intrônicas podem ainda incluir os elementos regulatórios de expressão de atuação cis.

As seqüências de ácido nucléico dos polipeptídios da presente invenção podem ser otimizadas para expressão da planta. Tais seqüências otimizadas são fornecidas na SEQ ID N°: 1317, 1319, 1320, 1321, 1322, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335 e 1336. Os exemplos de tais modificações de seqüência incluem, porém sem limitação, um teor de G/C alterado para aproximar-se mais estreitamente aquele tipicamente averiguado nas espécies de planta de interesse, e a remoção de códons atipicamente averiguada nas espécies de planta comumente mencionadas como otimização de códon.

A frase "otimização de códon" refere-se à seleção dos nucleotídeos apropriados de DNA para uso dentro de um gene estrutural ou fragmento do mesmo que

47

se aproxima à utilização do códon dentro de planta de interesse. Portanto, um gene ou seqüência de ácido nucléico otimizado refere-se a um gene em que a seqüência de nucleotídeo de um gene nativo ou naturalmente ocorrente foi modificada com a finalidade de utilizar os códons estatisticamente preferidos ou estatisticamente favorecidos dentro da planta. A seqüência de nucleotídeo tipicamente é examinada no nível de DNA e a região de compilação otimizada para expressão nas espécies de planta determinadas usando qualquer procedimento adequado, por exemplo, conforme descrito em Sardana et al. (1996, Plant Cell Reports 15:677-681). Nesse método, o desvio padrão da utilização do códon, uma medida da tendência de utilização do códon, pode ser calculado ao primeiro encontrar o desvio proporcional quadrado de utilização de cada códon do gene nativo relacionado ao de genes de planta altamente expressos, seguido por um cálculo do desvio quadrado médio. A fórmula usada é: 1 SDCU = n = 1N [(Xn - Yn) / Yn] 2 / N, em que Xn refere-se à freqüência de utilização do códon n em genes de planta altamente expressos, em que Yn, à freqüência de utilização do códon n no gene de interesse e N refere-se ao número total dos códons no gene de interesse. Uma tabela da utilização de códon a partir de genes altamente expressos das plantas dicotiledôneas é compilada utilizando os dados de Murray et al. (1989, Nuc Acids Res. 17:477-498).

Um método para otimizar a seqüência de ácido nucléico em conformidade com a utilização preferida do códon para um tipo específico da célula de

planta é com base no uso direto, sem realizar quaisquer cálculos estatísticos extras, das tabelas de otimização de códon, tais como, aqueles dispostos on-line no Banco de Dados de Utilização do Códon através do banco de DNA NIAS (Instituto Nacional de Ciências Agrobiológicas) no Japão (http://www.kazusa.ou.jp/codon/). O Banco de Dados de Utilização de Códon contém as tabelas de utilização de códon para um número de diferentes espécies, com cada tabela de utilização de códon tendo sido estatisticamente determinada com base nos dados presentes no Genbank.

Ao utilizar as tabelas acima para determinar os códons mais preferidos ou mais favorecidos para cada aminoácido em uma espécie específica (por exemplo, arroz), uma seqüência de nucleotídeo naturalmente ocorrente codificando uma proteína de interesse pode ser otimizada por códon para tal espécie de planta específica. Isso é efetuado pela substituição de códons que possam ter baixa incidência estatística no genoma específico das espécies com os códons correspondentes, com relação a um aminoácido, que é estatisticamente mais favorecido. Entretanto, um ou mais códons menos favorecidos podem ser selecionados para excluir os locais existentes de restrição, para criar novos em junções potencialmente úteis (extremidades 5' e 3' para adicionar o peptídeo de sinal ou cassetes de terminação, locais internos que poderiam ser usados para corte e dividir os segmentos juntos de modo a produzir uma seqüência correta de comprimento total), ou para eliminar as seqüências de nucleotídeo que poderiam

afetar negativamente a estabilidade ou expressão do mRNA.

A seqüência de nucleotídeo de codificação naturalmente ocorrente já pode, com antecedência de qualquer modificação, conter um número de códons que correspondem a um códon estatisticamente favorecido em uma espécie específica de planta. Portanto, a otimização de códon da seqüência de nucleotídeo nativa pode compreender a determinação de quais códons, dentro da seqüência de nucleotídeo nativa, não são estatisticamente favorecidos com relação a uma planta específica, e modificação desses códons em conformidade com uma tabela de utilização de códon da planta específica de modo a produzir um derivativo otimizado de códon. Uma seqüência de nucleotídeo modificada pode ser total ou parcialmente otimizada para a utilização de códon da planta, ressalvado que a proteína codificada pela seqüência de nucleotídeo modificada seja produzida em um nível maior do que a proteína codificada pelo gene nativo ou naturalmente ocorrente correspondente. A construção de genes sintéticos ao alterar a utilização de códon é descrita em, por exemplo, Pedido de Patente PCT 93/07278.

Dessa forma, a presente invenção abrange as seqüências de ácido nucléico acima descritas; seus fragmentos, seqüências passiveis de hibridização com relação a isso, seqüências homólogas a isso, seqüências ortólogas a isso, seqüências codificando os polipeptídios semelhantes com diferente utilização de códon, seqüências alteradas caracterizadas por mutações, tais como, exclusão, inserção ou substituição de um ou mais

50

nucleotídeos, sejam naturalmente ocorrentes ou induzidos pelo homens, sejam aleatoriamente ou de modo objetivo.

As seqüências de ácido nucléico da presente invenção podem codificar polipeptídios previamente descaracterizados.

Assim, a presente invenção fornece um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 81 %, pelo menos cerca de 82 %, pelo menos cerca de 83 %, pelo menos cerca de 84 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 86 %, pelo menos cerca de 87 %, pelo menos cerca de 88 %, pelo menos cerca de 89 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 91 %, pelo menos cerca de 92 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, pelo menos cerca de 99 %, ou mais, isto é, 100 % homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°: 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120, 122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 1341 ou 1343.

De acordo com uma configuração deste aspecto da presente invenção, o polipeptídio isolado compreende uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em 177, 110, 113, 114, 117, 118, 120,

61

122, 125, 128, 129, 132, 133, 136, 139, 141, 146, 151, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 173, 178, 179, 182, 186, 187, 188, 189, 193, 195, 196, 202, 203, 207, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 768-1051, 1053-1098,1100-1315,1316,1341 ou 1343.

A presente invenção também abrange as seqüências homólogas e ortólogas aos polipeptídios acima mencionados, os fragmentos dos polipeptídios e polipeptídios acima descritos com mutações, tais como, exclusões, inserções ou substituições de um ou mais aminoácidos, sejam naturalmente ocorrentes ou induzidos pelo homem, seja aleatoriamente ou de uma forma objetiva.

Os polinucleotídios e polipeptídios da presente invenção são utilizados para a expressão de planta.

O termo "planta", conforme aqui usado, abrange as plantas inteiras, progenitoras e progênie da plantas e partes da planta, incluindo sementes, brotos, talos, raízes (incluindo tubérculos), e célula de plantas, tecidos e órgãos. O termo "planta" também, portanto, abrange as culturas de suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, gametófitos, esporófitos, pólen e microesporos. As plantas que são especificamente úteis nos métodos da invenção incluem todas as plantas que pertencem à superfamília Viridiplantae, especificamente as plantas monodicotiledônea e dicotiledônea que são de valor comercial, incluindo uma forragem ou legume de forragem, planta ornamental, safra alimentícia, árvore ou arbusto

52

selecionado a partir da lista não limitante a seguinte compreendendo Acacia spp., Acer spp., Actinidia spp., Aesculus spp., Agathis australis, Albizia amara, Alsophila tricolor, Andropogon spp., Arachis spp, Areca catechu, Astelia fragrans, Astragalus cicer, Baikiaea plurijuga, Betula spp., Brassica spp., Bruguiera gymnorrhiza, Burkea africana, Butea frondosa, Cadaba farinosa, Calliandra spp, Camella sinensis, Canna indica, Capsicum spp., Cassia spp., Cent roema pubescens, Chaenomeles spp., Cinnamomum cassia, Coffea arabica, Colophospermum mopane, Coronillia varia, Cotoneaster serotina, Crataegus spp., Cucumis spp., Cupressus spp., Cyathea dealbata, Cydonia oblonga, Ciyptomeria laponica, Cymbopogon spp., Cynthea dealbata, Cydonia oblonga, Dalbergia monetaria, Davalila divaricata, Desmodium spp., Dicksonia squarosa, Diheteropogon amplectens, Dioclea spp, Dolichos spp., Doiycnium rectum, Echinochloa pyramidalis, Ehrartia spp., Eleusine coracana, Era grestis spp., Erythrina spp., Eucalyptus spp, Euclea .schimpen Eulalia villosa, Fagopyrum spp., Felloa sellowiana, Fragaria spp., Flemingia spp, Freycinetia banksii, Geranium thunbergi, Ginkgo biloba, Glycine javanica, Gliricidia spp, Gossypium hirsutum, Gre villea spp., Guibourtia coleosperma, Hedysarum spp., Hemarthia altissima, Heteropogon con tortus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum erectum, Hyperthelia dissoluta, Indigo incarnata, Iris spp., Jatropha curcas, Leptarrhena pyrolifolia, Lespediza spp., Lettuca spp., Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesi, Lotus spp.,

Macrotyloma axifiare, Malus spp., Manihot esculenta, Medicago sativa, Metasequoia glyptostroboides, Musa sapientum, Nicotianum spp., Onobtychis spp., Ornithopus spp., Oryza spp., Peltophorum african urn, Pennisetum spp., Persea gratissima, Petunia spp., Phaseolus spp., Phoenix canariensis, Phormium cookianum, Photinia spp., Picea glauca, Pinus spp., Pisum sativum, Podocarpus totara, Pogonarthria flecki, Pogonarthria squarrosa, Populus spp., Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesi, Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus spp., Rhaphiolepsis umbellata, Rhopalostylis sapida, Rhu.s natalensis, Ribes grossularia, Ribes spp., Robinia pseudoacacia, Rosa spp., Rub us spp., Salix spp., Schyzachyrium sanguineurn, Sciadopitys verticillata, Sequoia sempen'irens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum bicolor, Spinacia spp., Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stylosanthos humilis, Tadehagi spp, Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifollum spp., Triticum spp., Tsuga heterophylla, Vaccinium spp., Vicia spp., Vitis vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aethiopica, Zea mays, amaranto, alcachofra, aspargo, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, canola, cenoura, couve-flor, aipo, couve, linho, couve galega, lentilha, colza oleaginosa, quiabo, cebola, batata, arroz, soja, palha, beterraba, cana-de-açúcar, girassol, tomate, arbusto de abóbora, árvores.

Alternativamente, as algas e outras não Viridiplantae podem ser usadas.

A expressão do polinucleotídeo

54

exógeno da presente invenção dentro da planta pode ser efetuada ao transformar uma ou mais células da planta com o polinucleotídeo exógeno, seguido pela geração de uma planta madura a partir das células transformadas e cultivação da planta madura sob condições adequadas para expressar o polinucleotídeo exógeno dentro da planta madura.

Preferivelmente, a transformação é efetuada pela introdução na célula de planta uma construção de ácido nucléico que inclui o polinucleotídeo exógeno da presente invenção e pelo menos um promotor capaz de instruir a transcrição do polinucleotídeo exógeno na célula de planta. Os detalhes adicionais das abordagens adequadas de transformação são fornecidos abaixo.

Conforme aqui utilizado, o termo "promotor" refere-se a uma região do DNA que fica a montante do local de iniciação de transcrição de um gene, ao qual a polimerase de RNA aglutina-se para iniciar a transcrição do RNA. O promotor controla o local em que (p.ex., qual porção de uma planta, qual órgão dentro de um animal, etc.) e/ou quando (p.ex., qual etapa ou condição na vida de um organismo) o gene é expresso.

Qualquer seqüência de promotor adequada pode ser usada pela construção de ácido nucléico da presente invenção. Os seguintes tipos de promotores são os exemplos não limitantes de promotores usados para expressar em excesso os genes selecionados: promotores gerais, promotores específicos de raiz, promotores específicos de pontas de raiz, promotores de raiz induzidos por seca,

promotores induzido por estresse biótico, promotores induzidos por estresse abiótico, promotores induzidos por nitrogênio, promotores induzidos por amônia ou nitrato, promotores induzidos por fertilizante de fosfato, promotores específicos de folha, promotores induzíveis, promotores constitutivos, promotores com duas ou mais características acima descritas ou outros promotores recentes.

A escolha do promotor é com base amplamente no fenótipo de interesse e é determinada por tais fatores, como tecido (p.ex., semente, fruto, raiz, pólen, tecido vascular, flor, carpelo, etc.), possibilidade de indução (p.ex., em resposta a prejuízo, calor, frio, seca, luz, patógenos, etc.), ocasião, etapa de desenvolvimento e semelhante. Os numerosos promotores conhecidos foram caracterizados e podem favoravelmente ser utilizados para promover a expressão de um polinucleotídio da invenção em uma planta transgênica ou célula de interesse.

As medidas devem ser tomadas, entretanto, para selecionar um promotor que mediará os níveis desejáveis de expressão do transgene, de modo a evitar a nova alocação dos recursos energéticos excessivos que podem afetar a produção final, resistência, massa, alojamento e incidência dos patógenos foliares. Isso também deve ser visto de uma perspectiva econômica.

Os promotores constitutivos adequados incluem, por exemplo, promotor CaMV 35S (SEQ ID N°: 1337; Odell et al, Nature 313:810-812, 1985); promotor

Arabidopsis At6669 (SEQ ID N°: 1514, PCT N° WO2004/104162); TT105 (SEQ ID N°: 1339, PCT N°: WO2004/081173) milho Ubi 1 (Christensen et al, Plant Sol. Biol. 18:675-689, 1992); actina de arroz (McElroy et al, Plant Cell 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588, 1991); e Super MAS Sintético (Ni et al., The Plant Journal 7: 661-76, 1995). Outros promotores constitutivos incluem aqueles nas Patentes Norte-Americanas N°s 5.659.026. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597: 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; e 5.608.142.

Os promotores específicos de tecido adequados incluem, porém sem limitação, promotores específicos de folha, tais conforme descrito, por exemplo, por Yamamoto et al., Plant J. 12:255-265, 1997; Kwon et al, Plant Physiol. 105:357-67, 1994; Yamamoto et al, Plant Cell Physiol. 35:773-778, 1994; Gotor et al, Plant J. 3:509-18, 1993; Orozco et al, Plant Mol. Biol. 23:1129-1138, 1993; e Matsuoka et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9586-9590, 1993. Os especialmente preferidos são os promotores de raiz, tais como, promotor ROOTP [SEQ ID N°: 1338; Região a montante do gene ATXTH19 (AT4G30290, Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 19, descrito em Vissenberg K, et al. Plant Cell Physiol. 2005 Jan;46(1): 192-200].

Uma variedade dos promotores de gene de planta é conhecida para regular a expressão do gene em resposta aos sinais ambientais, hormonais, químicos, de desenvolvimento e de uma forma ativa de tecido. Os exemplos dos promotores específicos de semente (tais como, promotor

de napina, faseolina ou DC3 descrito na Patente Norte-Americana N° 5.773.697), promotores específicos de fruto que são ativos durante o amadurecimento do fruto, tais como, promotor dru 1 (Patente Norte-Americana N° 5.783.393), ou promotor 2A11 (Patente Norte-Americana N° 4.943.674) e o promotor de poligalacturonase de tomate (Bird et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11: 651-662), promotores específicos de raiz, tais como ARSK1, e aqueles revelados na Patente Norte-Americana N°s 5.618.988. 5.837.848 e 5.905.186, promotores específicos de epiderme, incluindo CUT1 (Kunst et al. (1999) Biochem. Soc. Tians. 28: 651-654), promotores ativos por pólen, tais como, PTA29, PTA26 e PTA 13 (Patente Norte-Americana N° 5.792.929), promotores ativos no tecido vascular (Ringli e Keller (1998) Plant Mol. Biol. 37: 977-988), específico de flor (Kaiser et al. (1995) Plant Mol. Biol. 28: 231-243), pólen (Baerson et al. (1994) Plant Mol. Biol. 26: 1947-1959), carpelos (Ohl et al. (1990) Plant Cell 2: 837-848), pólen e óvulos (Baerson et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 255-267), promotores induzíveis por auxina (tais como aqueles descritos em van der Kop et al. (1999) Plant Mol. Biol. 39: 979-990 ou Baumann et al. (1999) Plant Cell 11: 323-334), promotor induzível por citocinina (Guevara-Garcia (1998) Plant Mol. Biol. 38: 743-753), promotores responsivos a giberelina (Shi et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38: 1053-1060, Willmott et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38: 817-825) e semelhantes. Os promotores adicionais são aqueles que induzem a expressão em resposta ao calor (Ainley et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 13-23), light

(p.ex., o promotor de ervilha rbcS-3A, descrito em Kuhlemeier et al. (1989) Plant Cell 1: 471-478, e o promotor de milho rbcS, descrito em Schaffier e Sheen (1991) Plant Cell 3: 997-1012); prejuízo (p.ex., wunl, descrito em Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1: 961-968), patógenos (tais como, o promotor PR-1 descrito em Buchel et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40: 387-396, e o promotor PDF1.2 descrito em Manners et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38: 1071-1080), e químicos, tais como, metil jasmonato ou ácido salicílico (Gatz (1997) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89-108). Além disso, a ocasião da expressão pode ser controlada ao utilizar os promotores, tais como, aqueles atuando em senescência (Gan e Amasino (1995) Science 270: 1986-1988); ou desenvolvimento tardio de semente (Odell et al. (1994) Plant Physiol. 106: 447-458).

Outros exemplos de promotores são um promotor SUC2 (Truernit e Sauer, Plant. (1995) 196:564-70), e um promotor induzível por estresse, tal como, RD29A (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki K. Plant Cell (1994) 6:251-264), promotores do banco de dados PlantProm (Shahmuradov et al. Nucleic Acids Res. (2003) 31:114-7), o promotor de arroz CatB (Iwamoto et al. Plant Physiol Biochem. (2004) 42:241-9), os promotores específicos de raiz e promotores de cevada induzíveis por deficiência de fosfato da família do gene transportador de fosfato (HvPht1;1 e HvPht1;2) (Schunmann et al. (2004); 55:855-65), promotores específicos de tecido e constitutivos ilustrados na patente N°: WO2004/081173, na patente N°: US 5633363, na patente N°:

59

WO 2000/15662, na patente N°: WO 2004/013169, na patente N°: US 2005/010974, na patente N°: WO 2005/035770, na patente N°: US 2001/0047525, na patente N°: US 5837848, na patente N°: US 6018099, etc.

A construção de ácido nucléico da presente invenção preferivelmente ainda inclui um marcador selecionável apropriado e/ou uma origem de replicação. Preferivelmente, a construção de ácido nucléico utilizada é um vetor transporte, o qual pode propagar em E. coli (caracterizada pelo fato de que a construção compreende um marcador selecionável apropriado e origem de replicação) e ser compatível com a propagação nas células. A construção de acordo com a presente invenção pode ser, por exemplo, um plasmídio, a bacmídio, um fagemídio, um cosmídio, um fago, um vírus ou um cromossomo artificial.

A construção de ácido nucléico da presente invenção pode ser utilizada para transformar de modo estável ou transitório as células de planta. Na transformação estável, o polinucleotídeo exógeno da presente invenção é integrado no genoma da planta e, como tal, representa um traço estável e herdado. Na transformação transitória, o polinucleotídeo exógeno é expresso pela célula transformada, porém não integrada no genoma e, como tal, representa um traço transitório.

Existem diversos métodos para introduzir genes estranhos nas plantas monodicotiledônea e dicotiledônea (Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42:205-225; Shimamoto et al, Nature

(1989) 338:274-276).

Os métodos de princípios para provocar a integração estável do DNA exógeno no DNA genômico de planta incluem duas abordagens principais:

(i) Transferência de gene mediada por Agrobacterium: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee e Rogers in Cell Culture e Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in Plant Biotechnology, eds. Kung, S. e Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

(ii) Captação direta de DNA: Paszkowski et al, in Cell Culture e Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; incluindo métodos para captação direta do DNA em protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074. Captação do DNA induzida pelo breve choque elétrico das células de planta: Zhang et al. Plant Cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm et al. Nature (1986) 319:791-793. Injeção de DNA nas células de planta ou tecidos através de bombardeio de partícula, Klein et al Bio/Technology (1988) 6:559-563; McCabe et al Bio/Technology (1988) 6:923-926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79:206-209; pelo uso dos sistemas de micro-pipeta: Neuhaus et al, Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus e Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79:213-217; transformação de fibras de vidro ou

cristal capital de carboneto de silício das culturas de célula, embriões ou tecido de calo, Patente Norte-Americana N° 5.464.765 ou pela incubação direta do DNA com pólen de germinação, DeWet et al. in Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. e Mantell, S. H. e Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; e Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:715-719.

O sistema Agrobacterium inclui o uso de vetores de plasmídio que contêm segmentos definidos de DNA que integram no DNA genômico da planta. Os métodos de inoculação do tecido da planta variam dependendo das espécies de planta e do sistema de administração de Agrobacterium. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco de folha que pode ser realizada com qualquer explante de tecido que fornece uma boa fonte para iniciação de toda a diferenciação da planta. Horsch et al. in Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Uma abordagem complementar utiliza o sistema de administração de Agrobacterium em combinação com a infiltração a vácuo. O sistema Agrobacterium é especialmente viável na criação de plantas dicotiledôneas transgênicas.

Existem diversos métodos da transferência direta do DNA nas células de planta. Na eletroporação, os protoplastos são brevemente expostos a um forte campo elétrico. Na micro-injeção, o DNA é mecanicamente injetado diretamente nas células usando micro-pipetas muito pequenas. No bombardeio de micro-partículas, o

62

DNA é adsorvido em micro-projéteis, tais como, cristais de sulfato de magnésio ou partículas de tungstênio, e os micro-projéteis são fisicamente acelerados nas células ou tecidos de planta.

Após a transformação estável, a propagação de planta é exercida. O método mais comum da propagação de planta é pela semente. A regeneração pela propagação de semente, entretanto, possui a deficiência que devido à heterozigosidade, existe uma falta de uniformidade na safra, considerando que as sementes são produzidas pelas plantas de acordo com as variâncias genéticas regidas pelas regras Mendelian. Basicamente, cada semente é geneticamente diferente e cada crescerá com seus próprios traços específicos. Portanto, é preferido que a planta transformada seja produzida de modo que a planta regenerada possua os traços idênticos e características da planta transgênica precursora. Portanto, é preferido que a planta transformada seja regenerada pela micro-propagação que fornece uma reprodução rápida e consistente das plantas transformadas.

A Micro-propagação é um processo para crescer novas plantas de geração a partir de uma única peça de tecido que foi cortada de uma planta precursora selecionada ou cultivar. Esse processo permite a reprodução em massa das plantas com o tecido preferido expressando a proteína de fusão. As novas plantas de geração que são produzidas são geneticamente idênticas a, e possuem todas as características de, a planta original. A micro-propagação permite a produção em massa do material de planta

de qualidade e em um curto período de tempo e oferece uma rápida multiplicação de cultivares selecionados na preservação das características da planta transformada ou transgênica original. As vantagens da clonagem de plantas são a velocidade de multiplicação da planta e a qualidade e uniformidade das plantas produzidas.

A micro-propagação é um procedimento multi-etapa que exige a alteração das condições de crescimento ou meio de cultura entre as etapas. Dessa forma, o processo de micro-propagação envolve quatro etapas básicas: Etapa um, cultura do tecido inicial; etapa dois, multiplicação da cultura de tecido; etapa três, diferenciação e formação de planta; e etapa quatro, cultura e endurecimento em estufa. Durante a etapa um, cultura do tecido inicial, a cultura de tecido é estabelecida e certificada como livre de contaminante. Durante a etapa dois, a cultura de tecido inicial é multiplicada até um número suficiente de amostras do tecido ser produzido para atender as metas de produção. Durante a etapa três, as amostras de tecido cultivadas na etapa dois são divididas e cultivadas em plantinhas individuais. Na etapa quatro, as plantinhas transformadas são transferidas a uma estufa para endurecimento, em que a tolerância das plantas à luz é gradualmente aumentada, de modo que pode ser cultivada no ambiente natural.

Preferivelmente, as plantas transformadas maduras geradas conforme acima descrito são ainda selecionadas para o traço de interesse (p.ex., FUE

melhorado, tolerância ao estresse etc.). Os exemplos de tais ensaios de triagem são fornecidos abaixo e na seção de Exemplos que segue. Dessa forma, por exemplo, as plantas transgênicas podem passar por triagem para valor nutricional melhorado (p.ex., teor melhorado de óleo, aminoácidos e/ou proteína, bem como teor de N per se) sob condições normais ou de estresse conforme será ainda descrito abaixo. Alternativamente ou adicionalmente, as plantas transformadas e não transformadas (tipo selvagem) são expostas a uma condição de estresse abiótico, tal como, depravação de água, temperatura sub-ideal, deficiência de nutriente ou preferivelmente uma condição de estresse de sal. O estresse de sal pode ser efetuado de diversos modos, tais como, por exemplo, ao irrigar as plantas com uma solução hiperosmótica, ao cultivar as plantas de forma hidropônica em uma solução de crescimento hiperosmótica (p.ex., solução Hoagland), ou ao cultivar as plantas em um meio de crescimento hiperosmótico (p.ex., meio MS). Considerando que diferentes plantas variam consideravelmente em sua tolerância à salinidade, a concentração de sal na água de irrigação, solução de crescimento ou meio de crescimento é preferivelmente ajustada de acordo com as características específicas do cultivar ou variedade específica da planta, de modo a infligir um efeito suave ou moderado sobre a fisiologia e/ou morfologia das plantas para diretrizes com relação à concentração apropriada, vide, Bernstein e Kafkafi, Raiz Growth Under Salinity Stress. In: Plant Roots, The Hidden Half 3rd ed. Waisel Y, Eshel A e Kafkafi U.

(editors) Marcel Dekker Inc., New York, 2002, e referências lá contidas). Após a exposição à condição de estresse, as plantas são freqüentemente monitoradas até os efeitos substanciais fisiológicos e/ou morfológicos em plantas do tipo selvagem. Subseqüentemente, as plantas transformadas que não exibem os efeitos substanciais fisiológicos e/ou morfológicos, ou que exibem biomassa maior do que as plantas do tipo selvagem, são identificadas como plantas tolerantes ao estresse abiótico.

Embora a transformação estável é atualmente preferida, a transformação transitória das células de folha, células meristemáticas ou toda a planta também é considerada pela presente invenção.

A transformação transitória pode ser efetuada por quaisquer dos métodos de transferência direta do DNA acima descritos ou por infecção viral utilizando vírus modificados de planta.

Os vírus que foram demonstrados como úteis para a transformação de hospedeiros de planta incluem CaMV, TMV e BV. A transformação de plantas usando os vírus de planta é descrita na Patente Norte-Americana N° 4.855.237 (BGV), EP-A 67.553 (TMV), Pedido Publicado Japonês N° 63-14693 (TMV), EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); e Gluzman, Y. et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172-189 (1988). As partículas pseudo-virais para uso expressando o DNA estrangeiro em muitos hospedeiros, incluindo as plantas, são descritas em WO 87/06261.

Preferivelmente, o vírus da presente invenção é avirulento e, assim, é incapaz de provocar diversos sintomas, tais como, taxa reduzida de crescimento, mosaico, marcas de anel, rolo de folha, amarelado, listas, formação de pústula, formação de tumor e formação de sulcos. Um vírus avirulento adequado pode ser um vírus avirulento naturalmente ocorrente ou um vírus artificialmente atenuado. A atenuação de vírus pode ser efetuada ao usar os métodos bem conhecidos na técnica, incluindo, porém sem limitação, aquecimento sub-letal, tratamento químico ou por técnicas de mutagênese direcionada, tais conforme descrito, por exemplo, por Kurihara e Watanabe (Molecular Plant Pathology 4:259-269, 2003), Gal-on et al. (1992), Atreya et al. (1992) e Huet et al. (1994).

As cepas adequadas de vírus podem ser obtidas das fontes disponíveis, tais como, por exemplo, a Compilação de Cultura de Tipo Norte-Americana (ATCC) ou pelo isolamento das plantas infectadas. O isolamento dos vírus dos tecidos infectados de planta pode ser efetuado por técnicas bem conhecidas na técnica, tais conforme descrito, por exemplo, por Foster e Tatlor, Eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998. Brevemente, os tecidos de uma planta infectada acreditados como contendo uma alta concentração de um vírus adequado, preferivelmente folhas jovens e pétalas de flor, são afundados em uma solução

tampão (p.ex., solução tampão de fosfato) para produzir uma seiva infectada por vírus que pode ser utilizada em inoculações subseqüentes.

A construção dos vírus de RNA da planta para a introdução e expressão das seqüências de polinucleotídios exógenas não virais nas plantas é demonstrada pelas referências acima, bem como, por Dawson, W. O. et al, Virology (1989) 172:285-292; Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6:307-311; French et al Science (1986) 231:1294-1297; e Takamatsu et al. FEBS Letters (1990) 269:73-76.

Quando o vírus em um vírus de DNA, as modificações adequadas podem ser feitas ao próprio vírus. Alternativamente, o vírus pode ser primeiro clonado em um plasmídio bacteriano para facilidade de construir o vetor viral desejado com o DNA estranho. O vírus pode então ser cortado do plasmídio. Se o vírus for um vírus de DNA, uma origem bacteriana de replicação pode ser ligada ao DNA viral, que é então replicado pela bactéria. A transcrição e a tradução desse DNA produzirão a proteína de revestimento que encapsulará o DNA viral. Se o vírus for um vírus de RNA, o vírus é geralmente clonado como um cDNA e inserido em um plasmídio. O plasmídio é então usado para realizar todas as construções. O vírus de RNA é então produzido pela transcrição da seqüência viral do plasmídio e tradução dos genes virais para produzir a(s) proteína(s) de revestimento que encapsulam o RNA viral.

A construção dos vírus de RNA

da planta para a introdução e expressão nas plantas das seqüências de polinucleotídio exógeno não viral, tais como, aquelas incluídas na construção da presente invenção é demonstrada pelas referências acima, bem como na Patente Norte-Americana N° 5.316.931.

Em uma configuração, um polinucleotídio viral de planta é fornecido, em que a seqüência de codificação da proteína de revestimento nativa foi excluída a partir de um polinucleotídio viral, uma seqüência de codificação de proteína de revestimento viral da planta não-nativa e um promotor não nativo, preferivelmente o promotor sub-genômico da seqüência de codificação de proteína de revestimento não-nativa, capaz de expressão no hospedeiro de planta, empacotamento do polinucleotídio recombinante viral de planta, e garantir que uma infecção sistêmica do hospedeiro pelo polinucleotídio recombinante viral de planta, foi inserida. Alternativamente, o gene de proteína de revestimento pode ser desativado por inserção da seqüência de polinucleotídeo não nativa dentro da mesma, de modo que uma proteína seja produzida. O polinucleotídio recombinante viral de planta pode conter um ou mais promotores adicionais sub-genômicos não-nativos. Cada promotor sub-genômico não-nativo é capaz de transcrever ou expressar os genes ou seqüências de polinucleotídio adjacentes no hospedeiro de planta e incapaz de recombinação entre si e com promotores sub-genômico nativos. As seqüências de polinucleotídio não-nativas (estranhas) podem ser inseridas adjacentes ao promotor sub-

genômico viral de planta nativa ou os promotores sub-genômicos virais de planta não-nativas e nativas, se mais de uma seqüência de polinucleotídeo for incluída. As seqüências de polinucleotídio não nativos são transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle do promotor sub-genômico para produzir os produtos desejados.

Em uma configuracão secundária, um polinucleotídio recombinante viral de planta é fornecido conforme na primeira configuração, exceto que a seqüência de codificação da proteína de revestimento nativa é colocada adjacente a um dos promotores sub-genômico de proteína de revestimento não nativos, ao invés de uma seqüência de codificação de proteína de revestimento não-nativa.

Em uma terceira configuração, um polinucleotídio recombinante viral de planta é fornecido, em que o gene de proteína de revestimento nativo é adjacente ao seu promotor sub-genômico e um ou mais dos promotores sub-genômicos não-nativos foram inseridos no polinucleotídio viral. Os promotores sub-genômicos não-nativos são capazes de transcrever ou expressar os genes adjacentes em um hospedeiro de planta e são capazes de recombinação entre si com os promotores sub-genômicos nativos. As seqüências de polinucleotídio não nativas podem ser inseridas adjacentes aos promotores sub-genômicos virais de planta não nativos, de modo que as seqüências são transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle dos promotores sub-genômicos para produzir o produto desejado.

Em uma quarta configuração, um

polinucleotídio recombinante viral de planta é fornecido conforme na terceira configuração, exceto que a seqüência de codificação de proteína de revestimento nativa é substituída por uma seqüência de codificação de proteína de revestimento não-nativa.

Os vetores virais são encapsulados pelas proteínas de revestimento codificadas pelo polinucleotídio recombinante viral de planta para produzir um vírus de planta recombinante. O polinucleotídio recombinante viral de planta ou vírus de planta recombinante é usado para infectar as plantas hospedeiras apropriadas. O polinucleotídio recombinante viral de planta é capaz de replicação no hospedeiro, difusão sistêmica no hospedeiro, e transcrição ou expressão do(s) gene(s) estranho(s) (polinucleotídeo exógeno) no hospedeiro para produzir a proteína desejada.

As técnicas para inoculação dos vírus nas plantas podem ser encontradas em Foster e Taylor, eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998; Maramorosh e Koprowski, eds. "Methods in Virology" 7 vols, Academic Press, New York 1967-1984; Hill, S.A. "Methods in Plant Virology", Blackwell, Oxford, 1984; Walkey, D.G.A. "Applied Plant Virology", Wiley, New York, 1985; e Kado e Agrawa, eds. "Principles and Techniques in Plant Virology", Van Nostrand-Reinhold, New York.

Além do acima, o

polinucleotídio da presente invenção também pode ser introduzido em um genoma de cloroplasto, assim permitindo a expressão do cloroplasto.

Uma técnica para introduzir as seqüências de polinucleotídio exógeno ao genoma dos cloroplastos é conhecida. Essa técnica envolve os seguintes procedimentos. Primeiro, as células de planta são quimicamente tratadas, de modo a reduzir o número de cloroplastos por célula para cerca de um. Então, o polinucleotídeo exógeno é introduzido via bombardeio de partícula das células com o objetivo de introduzir pelo menos uma molécula de polinucleotídeo exógeno nos cloroplastos. Os polinucleotídeos exógenos selecionados, de modo que são passíveis de integração no genoma do cloroplasto via recombinação homóloga que é prontamente efetuada pelas enzimas inerentes ao cloroplasto. Para essa finalidade, o polinucleotídeo exógeno inclui, além de um gene de interesse, pelo menos um estiramento do polinucleotídio que é derivado a partir do genoma do cloroplasto. Além disso, o polinucleotídeo exógeno inclui um marcador selecionável, que atua por procedimentos seqüenciais de seleção para apurar que todas ou substancialmente todas as cópias dos genomas de cloroplasto após tal seleção incluirão o polinucleotídeo exógeno. Os detalhes adicionais relacionados a essa técnica são averiguados nas Patentes Norte-Americanas N°s 4.945.050; e 5.693.507 que são incorporadas no presente por referência. Um polipeptídio pode assim ser produzido pelo sistema de

expressão da proteína do cloroplasto e tornar-se integrado na membrana interna do cloroplasto.

Considerando que os traços da presente invenção (p.ex., NUE e tolerância ao estresse abiótico) nas plantas podem envolver múltiplos genes atuando de modo aditivo ou em sinergia (vide, por exemplo, em Quesda et al., Plant Physiol. 130:951-063, 2002), a presente invenção também considera a expressão de uma pluralidade dos polinucleotídeos exógenos em uma única planta hospedeira para assim atingir NUE superior, tolerância, biomassa e/ou produção.

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

Alternativamente, a expressão de uma pluralidade dos polinucleotídeos exógenos em uma única planta hospedeira pode ser efetuada pela co-introdução em uma única célula de planta uma única construção de ácido nucléico, incluindo uma pluralidade de diferentes polinucleotídeos exógenos. Tal construção pode ser projetada com uma única seqüência de promotor que pode transcrever uma mensagem policistrônica, incluindo todas as diferentes seqüências de polinucleotídio exógeno. Para permitir a co-tradução do diferentes polipeptídios codificados pela

mensagem policistrônica, as seqüências de polinucleotídio podem ser interligadas via uma seqüência de local de entrada de ribossomo interno (IRES) que facilita a tradução das seqüências de polinucleotídio posicionadas a jusante da seqüência IRES. Nesse caso, uma molécula de RNA policistrônica transcrita codificando os diferentes polipeptídios acima descritos será traduzida da extremidade 5' nivelada e duas seqüências internas IRES da molécula de RNA policistrônica, para assim produzir na célula todos os diferentes polipeptídios. Alternativamente, a construção pode incluir diversas seqüências de promotores, cada uma ligada a uma diferente seqüência de polinucleotídeo exógeno.

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

Alternativamente, a expressão de uma pluralidade dos polinucleotídeos exógenos em uma única planta hospedeira pode ser efetuada pela introdução de diferentes construções de ácido nucléico, incluindo diferentes polinucleotídeos exógenos, em uma pluralidade de plantas. As plantas transformadas regeneradas podem ser então criadas de forma cruzada e progênie resultante selecionado para trações superiores, tais como, NUE, tolerância ao estresse abiótico e/ou biomassa, usando as técnicas de criação de planta convencionais.

Conforme acima mencionado, as plantas transgênicas da presente invenção podem ser usadas

para melhorar em grande quantidade dos traços comercialmente desejados que são todos inter-relacionados conforme abaixo discutido.

Conforme aqui utilizado, o termo "traço" refere-se a uma característica ou qualidade de uma planta que pode de modo geral (seja direta ou indiretamente) melhorar o valor comercial da planta.

Conforme aqui utilizado, o termo "melhorando" ou "aumentando" refere-se a melhorar ou aumentar o traço da planta transgênica da presente invenção por pelo menos cerca de mais 2 %, mais 5 %, mais 10 %, mais 20 %, mais 30 %, mais 40 %, mais 50 %, mais 60 %, mais 70 %, mais 80 %, 90 % ou mais do que a planta não transgênica (p.ex., imitação transfectada ou simples).

Os seguintes são os exemplos ilustrativos dos traços que podem ser melhorados usando os polinucleotídeos ou polipeptídios da presente invenção.

Eficiência do uso de fertilizante — Embora o seguinte será melhor elaborado referente à Eficiência do Uso de Nitrogênio (N) (NUE), deve ser entendido que a presente invenção considera o aumento/melhoria da eficiência geral do uso de fertilizante de todos os minerais e metades orgânicas absorvidos do solo, tais como fosfatos (PUE) e potássio (KUE) pelas plantas transgênicas da presente invenção.

A eficiência através da qual o N é usado pela planta é afetada, entre outros, pela eficiência de captação do N e eficiência de utilização do N.

A proporção da quantidade de captação d N pela planta (ou teor de N, kg N) sobre a quantidade do N fornecido/aplicado (kg N_s) é uma eficiência de captação (kg N kg^{-1} N_s), enquanto a produção de grão (kg grain) para proporção da captação de N (kg N) é a eficiência de utilização do N (NUE, kg grão kg^{-1} N). Vide Moll 1982 Análise e interpretação dos fatores que contribuem para a eficiência da utilização de nitrogênio. Argon. J. 74:562-564. NUE também é efetuado pelas perdas de N através da volatilização de amônia, nitrificação-denitrificação, lixívia e escoamento que diminuem a disponibilidade do N na planta.

Os presentes inventores realizaram que os genes que alteram a arquitetura da raiz podem ser usados para melhorar o NUE. A base racional é para posicionar uma fração superior das raízes nas camadas mais profundas do solo em que o fertilizante é lixiviado ou aumenta a cobertura do solo em que o fertilizante está concentrado. Essa estratégia já foi comprovada de forma bem-sucedida com a deficiência de Fósforo na soja (Miller, CR, I Ochoa, KL Nielsen, D Beck, JP Lynch. 2003. Genetic variation for adventitious rooting in response to low phosphorus availability: potential utility for phosphorus acquisition from stratified soils. Functional Plant Biology 30:973-985) e milho (Zhu, J, JP Lynch. 2004. The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in milho (Zea mays L.) seedlings. Functional Plant Biology 31:949-958) e outras plantas de safra. A morfogênese da raiz é dramaticamente afetada pela programação de desenvolvimento,

bem como as condições ambientais. A seca leva a um desenvolvimento declinante pronunciado da estrutura da raiz para atingir a água localizada nas camadas mais profundas do solo (vide Figura 1A), enquanto a disponibilidade local do nutriente provoca o amadurecimento local da raiz aumentando a superfície total absortiva do sistema da raiz. O desenvolvimento dos sistemas raiz normalmente é altamente assimétrico e reflete a capacidade das raízes de ajustar seu crescimento e desenvolvimento para os fatores ambientais. Os genes e a expressão do gene controlam as alterações de desenvolvimento, conforme é o caso de ANR1: um fator putativo de transcrição com um papel na sinalização de NO_3^-.

Quando ANR1 é regulado de forma descendente por anti-mensageiro ou co-supressão, as linhas transgênicas resultantes são defeituosas em sua resposta de raiz para os suprimentos localizados NO_3^- (Zhang, H.,Forde, B. G. 1998, An Arabidopsis MADS box gene that controls nutriente-induced changes in root architecture, Science 270:407). Conseqüentemente, a alteração da expressão do polinucleotídeos da presente invenção nas plantas transgênicas pode ter os efeitos desejáveis na morfogênese da raiz, alguns deles poderiam afetar positivamente o NUE e tolerância ao estresse abiótico/biótico e/ou para otimizar a produção e vigor da planta. Os exemplos específicos incluem FUE_7, FUE_16 e FUE_34_Evo.

Adicionalmente, são selecionados aqueles que otimizam o armazenamento intracelular e reduzem a concentração citosólica, assim reduzindo

a barreira energética para os transportadores de membrana responsáveis pela captação de diferentes formas do fertilizante. Dessa forma, as taxas superiores da captação de fertilizante podem ser obtidas. De forma semelhante, conforme esperado de qualquer reação enzimática ou via, se o produto da assimilação do fertilizante for removido eficientemente para o ambiente celular, a via enzimática construindo esse produto é esperada para ocorrer na taxa acelerada levando à assimilação melhorada ou eficiência do uso.

Em ainda outra abordagem para melhorar FUE, um terceiro grupo de genes foi identificado. Esses genes são relacionados às vias bioquímicas envolvidas na conversão da forma do fertilizante inorgânico para o material orgânico (processo de assimilação). Os gargalos de liberação no processo de assimilação concederam efeitos prometedores sobre a eficiência otimizada do uso de nutrientes, conforme no caso do fator de transcrição Dof1 (Yanagisawa Sd, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation e growth under low-nitrogen conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 18;101(20):7833-8). Os genes encontrados usando essa abordagem aliviam os gargalos bioquímicos levando a uma eficiência otimizada do uso de fertilizante. FUE_101 e FUE_102 compreendem uma atividade de transportador e, portanto, podem ser usados para melhorar a captação de nutriente.

Capacidade de armazenamento - as seqüências de polinucleotídio e polipeptídio da presente invenção são instruídas para otimizar a capacidade geral de armazenamento da planta. A capacidade para a produção de grão é pré-determinada pela capacidade da planta de absorver e armazenar o nitrogênio mineral em suas etapas prematuras de desenvolvimento (Hirel et el. Plant Physiol, March 2001, Vol. 125, pp. 1258-1270). Portanto, a capacidade otimizada de armazenamento na forma de nitrato ou aminoácidos altamente tem a probabilidade de aumentar a produção de grão. Essa invenção inclui os mecanismos moleculares para melhorar o nitrogênio ou qualquer capacidade de armazenamento de nutriente metabólico da planta. Os exemplos incluem os aminoácidos, proteína, amido e óleo, fibra, cinza, clorofila e teor de mineral.

O teor de proteína da planta é diretamente relacionado à concentração do N no grão (vide Mosse 1990 J. Agric. Food Chem. 38:18-24). Isso é altamente valioso para melhorar o valor nutricional do alimento. Por exemplo, a alta proteína de consumo por crianças (10 %_ de arroz triturado mostrou crescimento melhorado comparado ao arroz triturado de proteína média de consumo por crianças (6-7 %) [Juliano (1993) Rice in Human Nutrition. IRRI e FAO, Rome]. Assim, as plantas transgênicas que exibem a alta eficiência na nova mobilização do N a partir das partes vegetativas para a parte comestível (p.ex., grão) são altamente valiosas. Considerando que os níveis do nitrogênio na floração determinam a produção do grão, a expressão em

excesso das seqüências de polinucleotídio da presente invenção melhorará a produção de grão e/ou otimizará o teor do grão em todo o nível da planta. Além disso, o teor aumentado de soluto da planta impede a evaporação e perda de água devido ao calor, seca, salinidade, osmótico, etc., portanto, melhorando uma melhor tolerância da planta aos estresses acima. A expressão em excesso de FUE_501, FUE_502, FUE_503, FUE_504 ou FUE_49, FUE_51, FUE_52, FUE_53 ou FUE_100 e FUE_101 é esperada para aumentar a capacidade de armazenamento dos tecidos em que são expressos. Isso pode levar a uma capacidade de submersão mais forte, e para um melhor uso do fertilizante aplicado (especificamente o nitrogênio) devido à absorção otimizada do solo. Considerando que os níveis de nitrogênio na floração determinam a produção do grão, é esperado que a expressão em excesso dos genes acima também melhorará a produção de grão e/ou melhorar o teor de proteína do grão e todo o nível de proteína da planta. Além disso, o teor aumentado do soluto da planta impedirá a evaporação e perda de água devido ao calor, seca, salinidade, osmótico e semelhante, assim melhorando uma melhor tolerância da planta aos estresses acima.

Senescência atrasada da folha ou "permanência do verde" - prolonga a captação do nutriente por mais tempo no ciclo da planta fornecendo capacidade aumentada para armazenar o nitrogênio e fornecer a fotossíntese durante o enchimento do grão. Se uma planta possuir mais folhas verdes no período de polinização, mais

nitrogênio estará disponível para redistribuição às sementes provocando uma melhoria na eficiência do uso de fertilizante e provavelmente a produção de grão. Alguns dos genes apresentados nesta invenção aumentam o traço de "permanência do verde" ou exibem crescimento otimizado (crescimento mais rápido e/ou folhas e talos maiores) como um mecanismo para melhorar a eficiência do uso de fertilizante, produção de grão e tolerância geral ao estresse da planta.

A invertase é uma enzima que é conhecida por atrasar a senescência quando expressa sob um promotor ativado por senescência (Balibrea Lara, et al. Plant Cell 16: 1276-1287, 2004). FUE_30 e FUE_31 possuem uma atividade prevista de invertase e, portanto, pode prolongar as características de permanência do verde da planta e, portanto, aumentar a capacidade geral para armazenar o nitrogênio nas plantas para redistribuição durante o enchimento de grão.

A citocinina é envolvida, entre outros processos, na inibição da senescência de folha. FUE_55 é um gene com uma semelhança notável ao isopenteniltransferase tRNA, uma importante enzima na via metabólica da citocinina. A expressão aumentada de FUE_55 nas raízes ou brotos aumentará os níveis da citocinina levando à expansão otimizada da folha e duplicação da célula, senescência atrasada, resistência aumentada de submersão dos tecidos, utilização otimizada do nitrogênio, etc.

A zeatina é uma citocinina

naturalmente ocorrente. FUE_505 é um fato de transcrição contendo domínio AP2 putativo que, com base nos experimentos de micro-agrupamento, ela aglomera-se firmemente junta com os genes de ARR (reguladores de resposta de Arabidopsis) que mediam a resposta do broto to citocinina. Os genes de ARR são a Zeatina responsiva e são induzidos após a adição do nitrogênio às plantas deficientes em nitrogênio. A co-regulação de FUE_505 junto com os ARRs indica um papel na resposta de citocinina. É altamente provável que a expressão constitutiva de FUE_505 atrasará a senescência de folha e melhorará a utilização do nitrogênio e crescimento de planta devido à ativação contínua da resposta de citocinina do broto.

Tolerância ao estresse - As plantas transgênicas da presente invenção são esperadas para exibir tolerância ao estresse abiótico e biótico.

O termo "estresse" aqui utilizado refere-se a qualquer efeito adverso sobre o metabolismo, crescimento, reprodução e/ou viabilidade de uma planta. De forma correspondente, o estresse abiótico pode ser induzido pelas condições sub-ideais de crescimento ambiental, tais como, por exemplo, salinidade, depravação de água, inundação, congelamento, baixa ou alta temperatura, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutriente (também incluindo inacessibilidade de nutriente, tal como, devido à lixiviação), poluição atmosférica ou irradiação UV. O estresse biótico pode ser induzido, por exemplo, por patógenos que são encontrados no ambiente.

A frase "tolerância ao estresse" conforme aqui utilizada refere-se à capacidade de uma planta de suportar um estresse (abiótico) sem sofrer uma alteração substancial no metabolismo, crescimento, produtividade e/ou viabilidade. Preferivelmente, as plantas geneticamente projetadas da presente invenção exigem pelo menos cerca de mais 2%, mais 5 %, mais 10 %, mais 20 %, mais 30 %, mais 40 %, mais 50 %, mais 60 %, mais 70 %, mais 80 %, mais 90 % ou ainda tolerância mais alta ao estresse abiótico do que as plantas não transgênicas.

As plantas são sujeitas a uma faixa de desafios ambientais. Diversos desses, incluindo estresse por sal, estresse osmótico geral, estresse por seca e estresse por congelamento, possuem a capacidade de ter o impacto sobre toda a planta e disponibilidade de água celular. De forma não surpreendente, então, as respostas de planta para essa compilação de estresses são relacionadas. Em uma revisão recente, Zhu observou que "a maioria dos estudos sobre sinalização do estresse de água enfocaram no estresse de sal principalmente devido às respostas de planta ao sal e seca serem estreitamente relacionadas e os mecanismos sobrepõem-se" (Zhu (2002) Ann. Rev. Plant Biol. 53: 247-273). Muitos exemplos de respostas e vias semelhantes para esse conjunto de estresses foram documentados. Por exemplo, os fatores da transcrição de CBF foram demonstrados para condicionar a resistência ao sal, congelamento e seca (Kasuga et al. (1999) Nature Biotech. 17: 287-291). O gene de rd29B Arabidopsis é induzido em

resposta aos estresses de sal e desidratação, um processo que é amplamente mediado através de um processo de transdução do sinal ABA (Uno et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11632-11637), resultando em atividade alterada dos fatores de transcrição que se aglutinam a um elemento a montante dentro do promotor rd29B. Na Mesembryanthemum crystallinum (planta de gelo), Patharker e Cushman demonstraram que uma quinase de proteína dependente de cálcio (McCDPK1) é induzida pela exposição aos estresses de seca e sal (Patharker e Cushman (2000) Plant J. 24: 679-691). A quinase induzida por estresse também foi mostrada para fosforilar um fator de transcrição, presumivelmente alterando sua atividade, embora os níveis de transcrição do fator alvo de transcrição não sejam alterados em resposta ao estresse de sal ou seca. De forma semelhante, Saijo et al. demonstraram que uma quinase de proteína dependente de calmodulina induzida por sal/seca do arroz (OsCDPK7) conferiu a tolerância aumentada ao sal e seca do arroz quando expresso em excesso (Saijo et al. (2000) Plant J. 23: 319-327).

A exposição à desidratação invoca estratégias semelhantes de sobrevivência nas plantas, assim como o estresse de congelamento (vide, por exemplo, Yelenosky (1989) Plant Physiol 89: 444-451) e o estresse de seca induz a tolerância ao congelamento (vide, por exemplo, Siminovitch et al. (1982) Plant Physiol 69: 250-255; e Guy et al. (1992) Plant 188: 265-270). Além da indução das proteínas de aclimatização ao frio, as estratégias que

permitir as plantas para sobreviver em condições de pouca água podem incluir, por exemplo, área de superfície reduzida, ou produção de cera ou óleo de superfície. Em outro exemplo, o teor aumentado de soluto da planta impede a evaporação e perda de água devido ao calor, seca, salinidade, osmótico e semelhante, portanto, fornecendo uma melhor tolerância da planta aos estresses acima.

Será apreciado que algumas vias envolvidas na resistência a um estresse (conforme acima descrito), também estarão envolvidas na resistência aos outros estresses, regulados pelos mesmos genes ou genes homólogos. Claramente, as vias gerais de resistência são relacionadas, não idênticas e, portanto, nem todos os genes controlando a resistência a um estresse controlarão a resistência aos outros estresses. Não obstante, se uma resistência das condições do gene a um desses estresses, seria aparente para aquele com habilidade na técnica para testar a resistência a esses estresses relacionados. Os métodos para avaliar a resistência ao estresse são ainda fornecidos na seção de Exemplos que segue.

A capacidade das plantas transgênicas da presente invenção de suportar o estresse é esperada para afetar a biomassa, vigor e produção da planta. O oposto também é antecipado para apresentar bons resultados, essencialmente, biomassa, vigor e/ou produção melhorados são esperados para melhorar a durabilidade das plantas transgênicas da presente invenção às condições de estresse.

Conforme aqui utilizado, a frase "biomassa da planta" refere-se à quantia ou quantidade do tecido produzido a partir da planta em uma temporada de crescimento, que também poderia determinar ou afetar a produção da planta ou a produção por área de crescimento.

Conforme aqui utilizado, o termo "vigor da planta" refere-se à quantia ou quantidade do tecido produzido a partir da planta em determinado tempo. Assim, o vigor aumentado poderia determinar ou afetar a produção da planta ou a produção por tempo de crescimento ou área de crescimento.

Conforme aqui utilizado, a frase "produção da planta" refere-se à quantia ou quantidade do tecido produzido e colhido como o produto produzido da planta. Assim, a produção aumentada poderia afetar o benefício econômico obtido da planta em determinado tempo de crescimento.

Para analisar o efeito do transgene em uma fisiologia da planta, a produção e biomassa geral podem ser avaliadas, a tolerância da plantas à deficiência do fertilizante e aos estresses abióticos, tais como, estresses de seca, salinidade, frio e calor, congelamento, etc. Também de grande importância é avaliar se a planta ou qualquer de suas partes contém um teor aumentado de proteína, livre de aminoácidos, óleo e quaisquer outros compostos metabólicos de valor.

O seguinte resume os ensaios que podem ser usados para qualificar as plantas transgênicas

ou transgenes da presente invenção (a descrição adicional desses e outros ensaios é fornecida na seção de Exemplos que segue).

Eficiência do uso de fertilizante - Para analisar se as plantas transgênicas são mais responsivas aos fertilizantes, as plantas são cultivadas em pratos de ágar ou vasos com uma quantidade limitada de fertilizante. As plantas são analisadas por seu tamanho geral, tempo para floração, produção, teor de proteína do broto e/ou grão. Uma metodologia de exemplo de um teste para eficiência do uso de fertilizante é fornecida no trabalho por Yanagisawa et al (Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101:7833-8) em que as sementes de Arabidopsis transgênico são verificadas para as taxas de crescimento sob condições limitantes de nitrogênio (por exemplo, em 0,01 mM, 0,05 mM 0,15 mM, 0,3 mM, 1 mM, 3 mM de Nitrogênio na forma de nitrato e amônia). Os parâmetros verificados são o tamanho geral da planta madura, seu peso seco e úmido, o peso das sementes produzidas, o tamanho médio da semente e o número das sementes produzidas por planta. Outros parâmetros que podem ser testados são: o teor de clorofila das folhas (como o status de planta do nitrogênio e o grau de frescor da folha é altamente correlacionado), teor total de aminoácido e de proteína das sementes ou outras partes da planta, tais como, folhas ou brotos, teor de óleo, etc. De forma semelhante, ao invés de fornecer o nitrogênio nas quantidades limitantes, o Fosfato ou Potássio pode ser adicionado em concentrações crescentes. Novamente, os mesmos

parâmetros medidos são os mesmos conforme acima listado. Dessa forma, além da Eficiência do Uso de Nitrogênio (NUE), a Eficiência do Uso de Fosfato (PUE) e a Eficiência do Uso de Potássio (KUE) são avaliadas, verificando a capacidade das plantas transgênicas de prosperar sob condições restringentes de nutriente.

Determinação do Nitrogênio - O procedimento para determinação da concentração do N nas partes estruturas das plantas envolve o método de digestão do persulfato de potássio para converter o N orgânico para NO_3^- (Purcell e King 1996 Argon. J. 88:111-113, a redução do Cd^- modificado mediante de NO_3^- to NO_2^- (Vodovotz 1996 Biotechniques 20:390-394) e a medição de nitrito pelo ensaio Griess (Vodovotz 1996, supra). Os valores de absorvência são medidos em 550 nm contra uma curva padrão de $NaNO_2$. O procedimento é descrito em detalhes em Samonte et al. 2006 Agron. J. 98:168-176.

Concentração da proteína do grão - O teor de proteína do grão (g proteína de grão m^{-2}) é estimado como o produto da massa do N de grão (g grão N m^{-2}) multiplicado por N/proporção de conversão da proteína de k-5,13 (Mosse 1990, supra). Uma concentração da proteína do grão é estimada como a proporção do teor de proteína do grão por massa unitária do grão (g proteína do grão kg^{-1} grão).

Teor de óleo - A quantidade do óleo expressa como uma porcentagem do peso seco. O teor de óleo é definido como a quantidade máxima do material (lipídio) que pode ser removida da semente por extração com

solventes específicos (normalmente hexano ou éter de petróleo). O teor de óleo é medido diretamente ao triturar a semente e extrair o óleo em um extrator contínuo. A análise indireta do teor de óleo pode ser realizada utilizando a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) ou Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NI). A técnica de NMR mede a energia de ressonância absorvida pelos átomos de hidrogênio no estado líquido da amostra, enquanto NI utiliza a absorção da energia infravermelha próxima (1100-2500 nm) pela amostra. Enquanto a precisão dos métodos de NIR não é tão boa quanto os métodos de extração, os métodos de NMR fornecem resultados muito precisos e exatos quando calibrados cuidadosamente.

Ensaio de tolerância à seca/Ensaio osmótico - A tolerância à seca é realizada para identificar os genes que conferem melhor sobrevivência da planta após depravação aguda de água. Para analisar se as plantas transgênicas são mais tolerantes à seca, um estresse osmótico produzido pelo sorbitol de osmolite não iônico no meio realizado. O controle e plantas transgênicas são germinados e cultivados em pratos de ágar de planta por 4 dias, após os quais eles são transferidos aos pratos contendo 500 mM de sorbitol. O tratamento provoca a retardação do crescimento, então as plantas de controle e transgênicas são comparadas, ao medir o peso da planta (seca e úmida), produção e pelas taxas de crescimento medidas conforme o momento para floração.

De forma oposta, as triagens de

seca com base em solo são realizadas com as plantas expressando em excesso os genes candidatos acima detalhados. As sementes das plantas de controle de Arabidopsis, ou outras plantas transgênicas expressando em excesso ou silenciando um polipeptídio da invenção são germinadas e transferidas aos vasos. O estresse de seca é obtido após a irrigação é interrompida, acompanhada pela colocação dos vasos em papel absorvente de modo a otimizar a taxa de secagem do solo. As plantas transgênicas e de controle são comparadas entre si quando a maioria das plantas de controle desenvolve o desvigor grave. As plantas foram regadas novamente após a obtenção de uma fracão significativa das plantas de controle exibindo um desvigor grave. As plantas são classificadas comparando aos controles para cada um dos dois critérios: tolerância às condições de seca e recuperação (sobrevivência) após nova rega.

Ensaio de tolerância à salinidade - As plantas transgênicas com tolerância ao alto sal são esperadas para exibir melhor germinação, vigor de muda ou crescimento em alto sal. As plantas diferem em sua tolerância ao NaCl, dependendo de sua etapa de desenvolvimento, portanto, a germinação de semente, vigor da muda e respostas de crescimento da planta são avaliadas. Um teste de tolerância à salinidade está obtendo as plantas em diferentes etapas de desenvolvimento e irrigá-las com concentrações crescentes de NaCl (por exemplo 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM) aplicadas a partir de baixo para cima de modo a garantir a dispersão uniforme do sal. As plantas

transgênicas são comparadas às plantas de controle em sua aparência fenotípica externa, grau de desvigor e sucesso geral para atingir a maturidade e progênie de produção em concentrações inibitórias às plantas de controle. Os parâmetros quantitativos da tolerância medida são, o peso médio de seco e úmido, e o peso das sementes produzidas, o tamanho médio da semente e o número de sementes produzidas por planta. Os ensaios de estresse osmótico (incluindo ensaios de NaCl e manitol) são conduzidos para determinar se um fenótipo de estresse osmótico era específico do NaCl ou se era um fenótipo geral relacionado ao estresse osmótico. As plantas tolerantes ao estresse osmótico também poderiam ter mais tolerância à seca e/ou congelamento. Para os experimentos de germinação de estresse de sal e osmótico, o meio é complementado, por exemplo, com 50mM, 100mM, 200 mM de NaCl ou 100mM, 200 mM de NaCl, 400 mM de manitol.

Tolerância ao estresse de frio - Para analisar o estresse de frio, as plantas maduras (25 dias) são transferidas para câmaras de 4 °C por 1 ou 2 semanas, com luz constitutiva. Após isso, as plantas são colocadas de volta na estufa. Duas semanas depois, os danos do período de frio, resultando em retardação de crescimento e outros fenótipos, são comparados entre as plantas de controle e plantas transgênicas, ao medir o peso da planta (seca e úmida), e ao comparar as taxas de crescimento medidas como o tempo para floração, tamanho da planta, produção, etc.

Tolerância ao estresse ao calor

- A tolerância ao estresse de calor é atingida ao expor as plantas em temperaturas acima de 34 °C por determinado período. A tolerância de planta é examinada após a transferência das plantas de volta a 22 °C para recuperação e avaliação após 5 dias relacionada aos controles internos (plantas não transgênicas) ou plantas não expostas ao estresse de frio ou calor.

Os testes de germinação comparam a porcentagem das sementes das plantas transgênicas que poderiam concluir o processo de germinação à porcentagem das sementes das plantas de controle que são tratadas da mesma forma. As condições normais são consideradas, por exemplo, incubações em 22 °C, sob luz de 22 horas com ciclos diários de 2 horas de escuro. A avaliação da germinação e vigor da muda é conduzida entre os dias 4 e 14 após a plantação. O meio basal é o meio Murashige-Skoog de 50% (MS)+vitaminas.

A germinação também é verificada em condições desfavoráveis, tais como, frio (incubação em temperaturas inferiores a 10 °C, ao invés de 22 °C) ou usando as soluções de absorção da semente que contêm altas concentrações de um osmólito, tal como, sorbitol (em concentrações de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM, e até 1000 mM) ou aplicação de concentrações crescentes de sal (de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM de NaCl).

Os métodos ensaiar o vigor da planta, produção e biomassa são bem-conhecidos na técnica

(vide Exemplo 9 e Exemplo 10).

A presente invenção também é valiosa para fins de procriação e ornamentais. Assim, é considerado que as seqüências de polinucleotídeo e polipeptídio da presente invenção, que são associadas com a arquitetura da raiz (FUE_34_Evo, SEQ ID N°: 54, vide também Exemplo 11 e Figura 8), também podem ser usadas para controlar o broto de planta e, como tais, poderão ser reguladas de forma ascendente ou reguladas de forma descendente para controlar a ramificação e broto. Os métodos para regular de modo descendente a expressão de gene nas plantas são bem-conhecidos na técnica.

Dessa forma, a presente invenção é de alto valor agrícola para promover traços comercialmente desejados nas plantas de safra.

Conforme aqui utilizado, o termo "cerca de" refere-se a + 10 %.

Os objetos adicionais, vantagens e novas características da presente invenção tornar-se-ão aparentes para aqueles com habilidade na técnica mediante o exame dos seguintes exemplos, que não têm a intenção de serem limitantes. Adicionalmente, cada uma das diversas configurações e aspectos da presente invenção, conforme abaixo delineada e conforme reivindicada na seção de reivindicações abaixo, encontra suporte experimental nos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

Referência agora é feita aos

seguintes exemplos, que junto com as descrições acima, ilustram a invenção de uma forma não limitante.

De modo geral, a nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos laboratoriais utilizados na presente invenção incluem as técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Tais técnicas são totalmente explicadas na literatura. Vide, por exemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et at., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologias conforme estabelecidas nas Patentes Norte-Americanas N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell e Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman e Co., New York (1980); os imuno-ensaios disponíveis são extensivamente descritos na patente e literatura científica, vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas N°s 3.791.932; 3.839.153;

3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 e 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos os quais são incorporados por referência como se totalmente aqui estabelecidos. As outras referências gerais são fornecidas por todo este documento. Os procedimentos são lá acreditados como sendo bem conhecidos na técnica e são fornecimento para conveniência do leitor. Todas as informações lá contidas são aqui incorporadas por referência.

EXEMPLO 1

Identificação de polinucleotídio e predição do papel do gene usando ferramentas moleculares e de bioinformática

Os polinucleotídeos, adequados para aumentar FUE e/ou tolerância ao estresse abiótico ou biótico, foram identificados por análise profunda dos perfis

de expressão do RNA, semelhanças da seqüência, anotações de gene, vias bioquímicas, DNA, ESTs, bancos de dados de expressão e proteína, que são publicamente disponíveis e usados como dados de entrada em uma série de algoritmos computacionais proprietários que permitem a mineração hábil de dados.

A associação de traço foi realizada usando a caracterização precisa de expressão através de PCR em Tempo Real quantitativo, para correlacionar entre os níveis de expressão em diferentes tecidos e sob condições específicas de crescimento para elucidar a função do polinucleotídio expresso.

Materiais e Métodos

Identificação das seqüências de polinucleotídio associadas com FUE aumentado

A presente metodologia é com base em três etapas, descritas nos seguintes exemplos, essencialmente a caracterização bioinformática, análise molecular e validação na planta. Acima está uma descrição do algoritmo bioinformático.

A. Caracterização bioinformática:

Aglutinação das seqüências de DNA em agrupamentos de gene - O objetivo do agrupamento de EST (Rótulo de Seqüência Expressa) é o de incorporar todos os ESTs que compartilham uma transcrição ou gene precursor ao mesmo agrupamento. Tipicamente, os ESTs agrupados são montados em um ou mais seqüências de consenso (clones) que

refletem a diversidade da transcrição, fornecendo esses clones, de modo que as informações que contêm refletem de modo mais verdadeiro a biologia amostrada. Um agrupamento de gene é fragmentado, os dados de EST e (se conhecido) dados de seqüência do mRNA de gene, consolidados, colocados no contexto correto e indexados pelo gene, de modo que todos os dados expressos referentes a um único gene esta em uma única classe de índice, e cada classe de índice contém as informações para somente um gene (Burke et al, 1999, D2_cluster: A Validated Method for Clustering EST and Full-length cDNA Sequences. Genome Research, 9(11),1135- 1142). A plataforma Compugen LEADS™ (http://www.cgen.com/research/Publications/LEADSwhitepaper.pdf) foi usada para a montagem.

Cálculo da expressão digital para todos os agrupamentos de gene em diversas espécies de planta - A expressão digital, também conhecida como electronic northern blot, compara as ocorrências de grande número de ESTs aleatórios das oscilações de cDNA não normalizadas. A variação na freqüência relativa de tais rótulos, variação na freqüência relativa de tais rótulos, armazenados em bancos de dados, é então usada para elucidar a expressão diferencial dos genes correspondentes. Os dados de Digital Northern podem ser usados para fornecer avaliação quantitativa de expressão diferencial entre os diferentes órgãos na planta ou em diferentes estados fisiológicos (estresse versus normal). Essa ferramenta exibe os perfis virtuais de expressão dos genes com base nas seqüências de

97

EST formando o agrupamento. A ferramenta pode fornecer o perfil de expressão de um agrupamento em termos da anatomia da planta (i.e., em quais tecidos/órgãos o gene é expresso), etapa de desenvolvimento (i.e., as etapas de desenvolvimento em que um gene pode ser averiguado) e perfil de tratamento (i.e., fornece as condições fisiológicas sob as quais um gene é expresso, tais como, seca, frio, infecção por patógeno e semelhante). Considerando uma distribuição aleatória de ESTs nos agrupamentos diferentes, a expressão digital fornece um valor de probabilidade que descreve a probabilidade de um agrupamento com um total de N ESTs para conter to X ESTs a partir de determinada compilação de oscilações. Para os cálculos de probabilidade do seguinte, é considerado: a) o número de ESTs no agrupamento, b) o número de ESTs originando-se de uma oscilação específica ou um grupo de oscilações relacionadas, c) o número geral de ESTs disponíveis representando as espécies. Dessa forma, os agrupamentos com baixos valores de probabilidade são altamente enriquecidos com ESTs a partir do grupo de oscilações de interesse indicando uma expressão especializada. Além disso, um vocabulário proprietário (compêndio limitado de termos) é usado que considera a anotação de cada oscilação de EST e utiliza palavras-chave específicas para descrever os dados experimentais associados com as seqüências com relação ao tipo de tecido, tratamento e etapas de desenvolvimento. Os termos escolhidos do vocabulário proprietário são combinados com a expressão digital calculada para construir um perfil de expressão para

cada gene específico, com base na fonte de oscilações que fornecem as seqüências ao agrupamento de gene. Uma representação estatística e gráfica desse perfil é construída para os cálculos da expressão digital. Devido às anotações serem de um vocabulário controlado, todo o banco de dados é dividido com palavras-chave específicas descrevendo os tecidos específicos, etapas de desenvolvimento ou tratamento.

Integração de todos os dados relevantes para cada gene, incluindo os dados de expressão a partir dos experimentos de micro-arranjo, expressão digital, anotação, ontologia, famílias de gene, motivos conservados e semelhantes - Uma ferramenta proprietária que cria os grupos de genes ortólogos a partir de bancos de dados genômicos de múltiplas espécies de planta é usada. Com a finalidade de fornecer o suporte adicional aos genes identificados, os genes ortólogos ou o grupo ortólogo são testados como um todo para ver o envolvimento do traço de interesse de acordo com as palavras-chave que são mais significativas em sua expressão digital calculada.

Seleção do gene - Isso é realizado de acordo com diversas assunções biologicamente idôneas para examinar o banco de dados acima descrito. A seleção de gene é realizada pela filtragem de grupos específicos dos genes usando critérios cuidadosamente selecionados. O conjunto final de genes deve conter um número limitado de genes, que poderiam ser manipulados na seguinte análise molecular e experimentos transgênicos. Os

diferentes critérios aqui utilizados são descritos em maiores detalhes para cada gene abaixo.

A seleção de gene para esta invenção considera diversos conceitos amplamente aceitos na ciência de planta. As deficiências de nutriente provocam adaptações da arquitetura da raiz, especificamente de forma notável, por exemplo, é a proliferação da raiz dentro das porções ricas em nutriente para aumentar a captação de nutriente. As deficiências de nutriente também provocam a ativação das vias metabólicas da planta, o que maximiza os processos de absorção e assimilação. Nesse processo, os genes são acionados e ativados provocando a alteração arquitetural (Jose Lopez-Bucio et al, The role of nutrient availability in regulating root architecture, Current Opinion in Plant Biology 2003, 6:280-287). A engenharia da expressão dos genes acionados pode fazer com que a planta exiba as alterações arquiteturais e o metabolismo otimizado também sob outras condições. Segundo, é amplamente conhecido que as plantas normalmente respondem à seca ao criar um sistema mais profundo de raiz que permite o acesso à umidade localizada em camadas mais profundas do solo (Morgan, J.M., e A.G. Condon. 1986. Water use, production of grain, e osmoregulation in wheat. Aust. J. Plant Physiol. 13:523-532 e Yiwei Jiang e Bingru Huang, 2001, Crop Science 41:1168-1173). O acionamento desse efeito permitirá que as plantas acessem os nutrientes localizados em horizontes mais profundos do solo, especificamente aqueles prontamente dissolvidos em água, como nitratos. Terceiro, diferentes

estresses abióticos (p.ex., seca, osmótico, frio, calor, radiação, salinidade, deficiências de nutriente e semelhantes) deduzem sua resposta usando: vias específicas do estresse, bem como vias comuns de estresse (Gabriela M. Pastori e Christine H. Foyer, Common Components, Newtorks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress, Plant Physiol., June 2002, Vol. 129, PP. 460-468). Isso fornece a possibilidade de distinguir entre os genes que estão envolvidos em cada via.

A resposta da planta ao estresse é dispendiosa em termos de energia, conforme tal afeta o rendimento da planta. A engenharia precisa dos genes específicos fornece a capacidade de ativar somente parcialmente uma resposta de estresse sem provocar a perda concomitante no rendimento. De forma correspondente, diversas pesquisas para distinguir os genes que são ativados durante as respostas comuns e específicas de estresse foram realizadas. Considerando que algumas respostas de planta, tais como, sistema de raiz otimizado ou capacidades superiores de armazenamento, são altamente preferidas da mesma forma nas condições ideais de crescimento, a presente invenção considera a criação das plantas modificadas com FUE melhorado que demonstra, além disso, também resposta otimizada aos outros estresses abióticos de planta que provocam efeitos adversos no rendimento.

Para fins de identificação dos genes melhorando o FUE, as seqüências de transcrição do mRNA 23563 e EST 416899 do Milho foram extraídas da liberação

Genbank 145 (dezembro de 2004), limpas por triagem para vetores, seqüências de baixa complexidade e repetições conhecidas dos bancos de dados públicos, e então agrupadas e montadas em clones usando a plataforma LEADS da Compugen.

As oscilações de EST no Genbank 146 para Milho e outras espécies, tais como, Soja, Tomate, Cevada, Sorgo, Arroz, Algodão, Trigo e Arabidopsis, foram examinadas e anotadas usando palavras-chave descrevendo o tecido de planta usado, o tratamento aplicado para cultivar as plantas e etapa de desenvolvimento das plantas quando os tecidos foram obtidos. Um valor de significância foi designado à freqüência de ESTs em cada clone a partir de cada oscilação de EST ou conjunto de oscilações compartilhando a mesma anotação. O valor de significância foi com base em um teste estatístico que considera o número de EST de determinada categoria no clone, o número desses ESTs em toda a produção, o tamanho e clone e número total de ESTs na produção.

Tabela 2: Expressão Digital de FUE_1 no milho: Anatomia

Palavra-Chave Primária	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
flor		4	89278	10,8145	0,369873	0,997498
	muda + flor fêmea	4	9012	1,09165	3,66417	0,0234977
folha		1	35689	4,32312	0,231314	0,989277
	orelha-folha	1	7960	1	1	0,622546
mistura		2	90046	10,9076	0,183359	0,999938
raiz		37	36059	4,36794	8,47082	1,78E-15
	sistema primário de raiz	24	33886	4,10472	5,84693	7,82E-14
	ponta da raiz	13	2173	1	13	2,22E-15
muda		6	32466	3,93271	1,52567	0,19702
	muda + flor fêmea	4	9012	1,09165	3,66417	0,0234977
	broto	1	16152	1,95654	0,511106	0,864469

Tabela 3: Expressão digital do grupo ortólogo FUE_1: Anatomia

	calo	câmbio	suspensão de célula	flor	semente de germinação	folha	mistura	floema	vagem	raiz	muda
algodão											0,26
uva				0,39							
milho				0,07		0,06	0,4			2,61	0,2
álamo		2,8						4,1		-	
arroz					0,9	0,08				5,25	1,24
sorgo	0,46		2								0,21
soja									1	0,31	0,11
tomate	1,46										
TOTAL	1,92	2,8	2	0,47	0,9	0,14	0,4	4,1	1	8,17	2,02

FUE_2 é uma proteína de função desconhecida exigindo uma expressão digital ligando-a às raízes e especificamente às raízes sob estresse de seca.

FUE_3 é uma proteína de transferência de lipídio não especifica putativa expressa especificamente nas raízes no milho (Tabela 4 e Tabela 5), porém também na cevada e arroz. Sua expressão nas raízes sob seca é conservada por toda a evolução no sorgo, milho, arroz e cevada (conforme mostrado nas Tabela 6 e 7). Existem indicações que o gene também é expresso sob estresse de salinidade na cevada e arroz e sob deficiência de nitrogênio na cevada.

Tabela 4: Expressão digital de FUE_3 no milho: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
flor		1	89278	7,82327	0,127824	0,999862
	muda + flor fêmea	1	9012	1	1	0,550246
mistura		2	90046	7,89057	0,253467	0,998578
raiz		30	36059	3,15978	9,49432	2,66E-15
	sistema primário de raiz	30	33886	2,96937	10,1032	0
muda		2	32466	2,84494	0,703003	0,789648
	muda + flor fêmea broto	1	9012	1	1	0,550246
		1	16152	1,41537	0,706529	0,764428

103

Tabela 5: Expressão digital de FUE_3 no milho: Tratamento

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
Seca		30	21216	1,85912	16,1367	3,44E-15
	Estresse de água 48h	17	6113	1	17	0
	Estresse de água 5h	6	6417	1	6	1,84E-05
	Estresse de água 5h e 48h, oscilação subtraída	7	2720	1	7	3,76E-09
mistura		2	36475	3,19624	0,625736	0,8422

Tabela 6: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_3: Anatomia

	colmo	flor	semente de germinação	grão	folha	mistura	raque	raiz	muda	broto
cevada milho arroz sorgo	1	0,07	0,39	0,19	0,03 0,24 0,67	0,34	2,24	1,4 2,66 0,9	0,18 0,08 031	0,2
TOTAL	1	0,07	0,39	0,19	0,95	0,34	2,24	4,95	0,58	0,2

Tabela 7: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_3: Tratamento

	seca	resposta à luz	mistura	deficiências de nutriente	patógeno	resposta de foto-período	salinidade	submerso
cevada milho arroz sorgo	0,81	0,92		0,53	0,07			1
	6,51		0,83					
	2,29					8	3,48	
	1,61				0,34			
TOTAL	11,22	0,92	0,83	0,53	0,42	8	3,48	1

5 FUE_4 também é uma proteína de função desconhecida exibindo a expressão digital específica sob estresse de seca (conforme mostrado na Tabela 8 e 9).

Tabela 8: Expressão digital de FUE_4 no milho: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
raiz		6	36059	1	6	6,44E-07
	sistema primário de raiz	6	33886	1	6	4,44E-07

104

Tabela 9: Expressão digital de FUE_4 no milho: Tratamento

Palavra-Chave		ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
seca		6	21216	1	6	2,67E-08
	estresse de água 48h	3	6113	1	3	7,54E-05
	estresse de água 5h	3	6417	1	3	8,71E-08

FUE_5 é um complexo de reductase C de Ubiquinol-citocromo C, como proteína, expressando sob diversos estresses e especificamente sob seca e salinidade no milho (conforme mostrado na Tabela 10) e raízes de arroz.

Tabela 10: Expressão digital de FUE_5 no milho: Tratamento

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
seca		16	21216	2,67932	5,97167	3,75E-09
	CONTROLE bem regado 0h	1	5966	1	1	0,532021
	estresse de água 48h	9	6113	1	9	6,92E-08
	estresse de água 5h	4	6417	1	4	0,00876739
	estresse de água 5h e 48h, oscilação subtraída	2	2720	1	2	0,0465022
mistura		3	36475	4,60634	0,651276	0,851418
Patógeno		1	2260	1	1	0,248934
	Fusarium, 6 h pós-infecção	1	667	1	1	0,0808552
Salinidade		3	3579	1	3	0,0105368
	150mM NaCl 24 h	3	3579	1	3	0,0105368

FUE_6 exibe homologia à proteína de dedo de zinco associada ao estresse, expressa no milho durante o desenvolvimento de grão e nas raízes, especificamente sob estresse de seca (conforme mostrado nas Tabelas 11 e 12, respectivamente). Os presentes inventores revelaram que FUE_6 e FUE_40 são parte da mesma transcrição. FUE_6 representa a região 5' da transcrição, enquanto FUE_40 a região 3'. Para conveniência, a transcrição é apresentada no presente sob o nome FUE_40.

Tabela 11: Expressão digital de FUE_6 no milho: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
grão		1	73038	2,07065	0,48294	0,899148
	gluma	1	2043	1	1	0,0564193
raiz		10	36059	1,02228	9,78202	4,83E-10
	sistema primário de raiz	10	33886	1	10	2,61E-10

Tabela 12: Expressão digital de FUE_6 no milho: Tratamento

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
seca		10	21216	1	10	2,50E-12
	CONTROLE bem regado 0h	2	5966	1	2	0,011856
	estresse de água 48h	1	6113	1	1	0,16028
	estresse de água 5h	4	6417	1	4	2,25E-05
	estresse de água 5 e 48h, oscilação subtraída	3	2720	1	3	5,44E-05

FUE_7 é uma proteína hipotética exibindo semelhança à proteína anti-congelamento expressa

predominantemente na cevada e milho nas raízes e com uma expressão mais evidente durante o estresse de seca (conforme mostrado na Tabela 13 e 14).

Tabela 13: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_7: Anatomia

	flor	grão	folha	mistura	raiz	muda
cevada		0,96	0,33		1,86	0,21
milho sorgo	0,15	0,83		0,39	4,28	0,34
			1,13			
TOTAL	0,15	1,79	1,46	0,39	6,14	0,55

Tabela 14: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_7: Tratamento

	seca	patógeno	salinidade	submerso
cevada milho	3,47	0,38		1
sorgo	9,64	1		
	7,75			
TOTAL	20,87	0,38	1	1

FUE_8 exibe homologia a tioesterase Acyl-ACP e expresso nas raízes de milho sob estresse de seca (conforme mostrado na Tabela 15). Os ortólogos de sorgo e arroz também mostram uma associação clara com a seca, conforme revelado pela fonte das seqüências compondo os genes.

Tabela 15: Expressão digital de FUE_8 no milho: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
raiz		6	36059	1	6	6,44E-07
	sistema primário de raiz	6	33886	1	6	4,44E-07

FUE_9 é uma proteína hipotética expressa nas raízes de milho sob estresse de seca.

FUE_10 exibe homologia às proteínas associadas ao transporte do elétron, exibindo uma forte expressão de raiz exclusivamente associada com a seca no milho (conforme mostrado na Tabela 16 e 17) e aos outros

estresses abióticos conforme averiguado para sua expressão ortóloga na soja.

Tabela 16: Expressão digital de FUE_10 no milho: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
flor		1	89278	3,22135	0,310429	0,974291
	muda + flor fêmea	1	9012	1	1	0,280367
grão		1	73038	2,63537	0,379453	0,946054
	pericarp	1	9389	1	1	0,290325
mistura		2	90046	3,24906	0,615563	0,870275
raiz		8	36059	1,30109	6,1487	9,97E-06
	sistema primário de raiz	8	33886	1,22268	6,543	6,26E-06
muda		2	32466	1,17145	1,70729	0,329608
	muda + flor fêmea broto	1	9012	1	1	0,280367
		1	16152	1	1	0,448596

Tabela 17: Expressão digital de FUE_10 no milho: Tratamento

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
seca		8	21216	1	8	1,78E-07
	estresse de água 48h estresse de água 5h estresse de água 5h e 48h, Oscilação subtraída	5	6113	1	5	1,72E-06
		2	6417	1	2	0,0218099
		1	2720	1	1	0,093796
mistura		2	36475	1,3161	1,51964	0,384279

FUE_11 exibe homologia à proteína induzida por impedância física e é expresso no milho nas raízes também durante os estresse de seca.

FUE_12 é uma proteína desconhecida expressa nas raízes de milho sob estresse de água 5 (seca) e em outros estresses abióticos, tais como, seca na cevada e sob deficiência de nitrogênio e estresse de calor no sorgo.

FUE_13 exibe homologia à proteína relacionada a Patogênese 10, e é expressa é

diferentes estresses no milho (seca, patógenos como Fusarium). Os ortólogos de cevada e arroz são fortemente expressos especificamente sob estresses abióticos e bióticos ligando essa proteína à resposta de planta ubíqua ao estresse.

FUE_14 é uma proteína do milho exibindo homologia à proteína semelhante a Germina 6. A expressão digital de seu ortólogo de cevada liga essa proteína à resposta de patógeno, bem como à resposta de seca e deficiência de nitrogênio.

FUE_15 é uma proteína regulada por auxina putativa expressa nas raízes de milho. Seus ortólogos da cevada, arroz e são relacionados à seca, bem como outros estresses abióticos e bióticos, tais como, resposta de patógeno. No tomate e soja, a proteína é ligada à resposta aos patógenos e deficiências de nutriente.

FUE_16 é uma proteína semelhante a Uclacianina 3, expressa fortemente nas raízes de milho sob estresse de água (conforme mostrado na Tabela 18 e 19). Seus ortólogos da cevada, arroz, soja e tomate também são expressos nas raízes, porém envolvidos na resposta aos outros estresses abióticos e bióticos especificamente a resposta à luz (conforme mostrado na Tabela 20 e 21).

Tabela 18: Expressão digital de FUE_16 no milho: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
flor		3	89278	3,91163	0,766943	0,78613
	muda + flor fêmea	3	9012	1	3	0,00667346
Raiz		14	36059	1,57989	8,86136	1,86E-12
	Sistema primário de raiz	14	33886	1,48468	9,42961	7,90E-13
muda		3	32466	1,42247	2,10901	0,165456
	muda + flor fêmea	3	9012	1	3	0,00667346

109

Tabela 19: Expressão digital de FUE_16 no milho: Tratamento

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
Seca		14	21216	1	14	3,77E-15
	CONTROLE bem regado 0h estresse de água 48h estresse de água 5h estresse de água 5h e 48h, Oscilação subtraída	2	5966	1	2	0,0275854
		4	6113	1	4	0,000124308
		6	6417	1	6	2,16E-07
		2	2720	1	2	0,00622988

Tabela 20: Expressão digital do grupo ortólogo de Fuel_16: Anatomia

	colmo	flor	folha	mistura	raiz	semente	muda	broto	xilema
cevada	1	0,45	0,1		0,48				
milho		0,17			2,14		0,48		
álamo					0,24				1,57
arroz				0,33	3,62		0,51		
sorgo							0,4		
soja		0,49	0,04	0,07	0,43	3	0,71	0,46	
tomate					0,48				
TOTAL	1	1,11	0,14	0,41	7,41	3	2,11	0,46	1,57

Tabela 21: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_16: Tratamento

	tratamento químico	seca	estresse de calor	light stress	resposta à luz	nodulação	deficiências de nutriente	Patógeno	salinidade
cevada					0,63				
milho			3,98						
álamo							1,12		
arroz	1				0,63				2
sorgo					1,9				
soja	1	1		1	1,56	5	2,85	1,09	
tomate							1,12		
TOTAL	2	1	3,98	1	4,73	5	5,09	1,09	2

110

FUE_17 é uma proteína hipotética exibindo uma expressão digital no milho e outras espécies de planta ligando-a à resposta da seca (milho, cevada e sorgo), aos patógenos (arroz, soja e tomate) e à deficiência de nitrogênio e submersão na cevada.

FUE_30 e FUE_31 foram selecionados devido a sua anotação e teor de EST significativo derivado da raiz, especificamente no caso de FUE_30. FUE_30 e FUE_31 possuem uma atividade prevista de invertase, uma enzima que é conhecida por atrasar a senescência quando expressa sob o promotor ativado por senescência (Balibrea Lara, et al. Plant Cell 16: 1276-1287, 2004). FUE_30 pode prolonga as características de permanência de verde da planta e, portanto, aumentar a capacidade geral de armazenar o nitrogênio nas plantas para redistribuição durante o enchimento de grão.

FUE_32 é anotado como uma proteína principal semelhante intrínseca e seu ortólogo de trigo contém diversas seqüências isoladas da raiz. Além disso, o gene de milho selecionado demonstra homologia Brevis Radix. Brevis Radix é um novo regulador de proliferação de célula e alongamento que, quando desativada, cria as plantas com raízes mais curtas (Mouchel at al., Genes and Development Vol. 18:700-714, 2004).

FUE_54 exibe homologia a uma proteína responsiva de Auxina. Os genes contêm uma anotação de EST significativa das raízes e tecidos estressados, bem como seu melhor ortólogo do sorgo e arroz que são

111

especialmente expressados sob condições de estresse e provavelmente enriquecidos na raiz.

FUE_33 e FUE_100 codificam as nitrilases. A Nitrilase é uma enzima importante na via biosintética de auxina que converte 3-indoleacetonitrila para ácido acético 3-indole (auxina). A expressão aumentada das Nitrilases na raiz ampliará os níveis gerais de auxina e induzirá o alongamento da raiz, formação secundária da raiz, resposta otimizada gravitrópica, etc.

FUE_34 e FUE_35, bem como, FUE_46 e FUE_47, são fatores prováveis de transcrição, tanto expressos especificamente nas raízes estressadas, quanto considerados pelas oscilações de EST fornecendo as seqüências dos genes. Como esses fatores de transcrição são altamente associados com as oscilações de estresse de água, pode ocorrer que ao modificar a expressão desses genes, os genes que induzem as alterações estruturais e metabólicas associadas com os estresses serão ativados.

FUE_36, FUE_37 e FUE_38 mostram algum grau de semelhança aos genes responsivos de ABA e/ou genes anotados de estresse, e possuem um teor significativo das seqüências derivadas das oscilações de raiz. FUE_36 possui provavelmente atividade de quinase de proteína com uma semelhança notável a um SAPK8, uma proteína que seus níveis de expressão são aumentados durante o tratamento de ABA ou sob condições de salinidade, demonstrando um papel na resposta do stress. FUE_37 possui quase todas as seqüências derivadas da raiz e especificamente raiz sob estresse de

água (conforme mostrado nas Tabelas 22 e 23). Os ortólogos da cevada, trigo e cana de açúcar também suportam a argumentação de que o gene é principalmente expresso nas raízes. Existem indicações que esse gene implica na resposta ao estresse de depravação da água, resposta de salinidade hiperosmótica, frio e outros estresses.

Tabela 22: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE__37: Anatomia

	calo	fruto	folha	mistura	raiz	muda	talo	xilema
cevada			0,35		0,84	0,24		
uva		2,37						
milho				0,26	0,84			
álamo			0,09					7
arroz	0,26		0,34					
soja	0,29		0,2	0,31	0,21		1	
TOTAL	0,55	2,37	0,99	0,57	1,9	0,24	1	7

Tabela 23: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE3 7: Tratamento

	seca	hormônio	mistura	nodulação	patógeno	salinidade
cevada	1,19				0,14	
milho	0,4					1
arroz	2,38	0,36				
soja	0,4		0,69	1		
TOTAL	4,37	0,36	0,69	1	0,14	1

FUE_38 é derivado de diversas oscilações de raiz estressada (conforme mostrado nas Tabelas 24 e 25) e exibe uma semelhança notória a PKABA1. Os níveis de transcrição de PKABA1 são escassamente detectáveis nas mudas de crescimento, porém são induzidos dramaticamente quando as plantas são sujeitas à desidratação, frio e estresse osmótico (Holappa LD e Walker-Simmons MK Plant

Physiol. Vol. 108:1203-1210, 1995). Um padrão modificado de expressão para esse gene pode fornecer tolerância aumentada ao estresse abiótico, vigor aumentado, produção aumentada e melhor eficiência de uso dos fertilizantes.

Tabela 24: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_38: Anatomia

Palavra-Chave	Palavra-Chave Secundária	ESTs em Gene	ESTs na Produção	ESTs Esperados	Dobra	Valor p
cultura de célula		3	16132	1	3	0,0367348
flor		1	89278	4,14173	0,241445	0,990968
	muda +flor fêmea	1	9012	1	1	0,344935
grão		1	73038	3,38834	0,29513	0,976577
	endosperma	1	25774	1,19569	0,836336	0,709829
mistura		2	90046	4,17736	0,478771	0,944464
raiz		10	36059	1,67283	5,9779	1,04E-06
	sistema primário de raiz	10	33886	1,57202	6,36125	5,83E-07
muda		1	32466	1,50614	0,663948	0,792566
	muda + flor fêmea	1	9012	1	1	0,344935

Tabela 25: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_38: Tratamento

	seca	tratamento de hormônio	resposta à luz	tratamento mecânico	mistura	nodulação	patógeno	salinidade
cevada	0,26							0,93
milho	2,3				0,45			0,93
arroz			0,65				0,13	
sorgo	0,26	0,46		2				0,93
soja	0,26					2,75	0,14	
TOTAL	3,07	0,46	0,65	2	0,45	2,75	0,27	2,8

FUE_48 foi selecionado usando os dados de expressão de Arabidopsis de micro-arranjo disponível em (http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/supersearch.pl?searchterms=afgn).

Os genes com expressão enriquecida nas raízes e altamente responsivos a ABA e estresses abióticos (salinidade, osmótico e frio) foram identificados. Um dos genes possuía um ortólogo no milho (FUE_48) que demonstrou teor otimizado das seqüências derivadas de raiz. O ortólogo provável de sorgo é um gene principalmente composto pelas seqüências derivadas do estresse, especificamente das condições do estresse de água e seca (conforme mostrado na Tabela 26). FUE_48 mostra semelhança a SIP (Proteína de Submersão da Semente).

Tabela 26: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_48: Tratamento

	seca	estresse de calor	tratamento de hormônio	resposta à luz	Nematóide	deficiências de nutriente	patógeno	salinidade
cevada	0,98							
algodão							0,09	
milho	0,73							0,18
álamo			0,11			0,23	0,25	
arroz	0,51			0,19			0,27	0,53
sorgo	3,20	0,71	0,04	0,15				
soja				0,41	1,78	0,40	0,16	0,18
tomate			0,12			0,13		
TOTAL	5,42	0,71	0,27	0,75	1,78	0,76	0,77	0,89

FUE_39 é uma proteína aglutinante de Ca^{++} semelhante a calcineurina B expressa pela raiz. As calcineurinas são Ca^{++} que sentem as quinases de proteína reguladas diferencialmente pelas condições de estresse, tais como, estresse de sal, seca, frio e prejuízo. O cálcio é envolvido em diversos comportamentos importantes de raiz, tal como, gravitropismo, hidrotropismo, etc., e é um importante segundo mensageiro para diversas vias de

transdução de sinal. A ativação contínua da cascata de proteína em que FUE_39 está envolvido pode fornecer propriedades vantajosas ou traços desejados comparados a uma planta de referência, incluindo tolerância melhorada ao estresse abiótico, vigor e produção aumentados, uso melhorado do fertilizante, etc.

FUE_40 e FUE_41 são os genes expressos nas raízes especificamente nas condições de estresse. O ortólogo de sorgo de FUE_40 possui diversas seqüências derivadas dos tecidos estressados, incluindo as raízes. FUE_41 e FUE_40 mostram semelhança às proteínas responsivas de estresse.

FUE_43, FUE_44 e FUE_45 possuem uma semelhança distante a uma proteína de estresse universal de E. coli e suas seqüências de composição contêm uma fração significativa dos tecidos estressados de raiz (conforme mostrado na Tabela 27 para FUE_43 e na Tabela 28 para FUE_44).

FUE_43 mostra semelhança a uma proteína responsiva de etileno. FUE_44 e FUE_45 mostram uma fraca semelhança a uma proteína semelhante à nodulina prematura. Essas proteínas expressadas de forma ectópica ectopicalmente sob um diferente promotor têm a probabilidade de produzir efeitos favoráveis nas plantas transgênicas, tais como, tolerância otimizada ao estresse, crescimento melhorado em condições ideais e adversas, principalmente devido às prováveis modificações na arquitetura da raiz.

Tabela 27: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_43:

116

Tratamento

	Oscilação de Controle	seca	Tratamento de hormônio	resposta à luz	mistura	nodulação	deficiências de nutriente	patógeno	salinidade
cevada	1,00			0,33				0,09	
milho		1,42			1,55				0,83
arroz		0,83		1,64					
sorgo		1,60		0,91			0,63		
soja			0,43			0,81		0,22	
tomate								0,10	
TOTAL	1,00	3,86	0,43	2,88	1,55	0,81	0,63	0,41	0,83

Tabela 28: Expressão digital do grupo ortólogo de FUE_44:

Tratamento

	tratamento químico	Seca	resposta à luz	nematóide	deficiências de nutriente	patógeno	salinidade	submerso
cevada		0,66				0,28		
uva						0,07		
milho		0,92					1,69	
álamo					0,52	0,20		
arroz			0,50			0,07		
sorgo		0,66	0,50					
soja	3,00	0,44	0,33	2,00	1,30	0,08	0,85	5,00
tomate								
TOTAL	3,00	2,67	1,34	2,00	1,82	0,69	2,54	5,00

FUE_50 foi selecionado utilizando os dados de expressão de Arabidopsis de micro-arranjo, em que os genes específicos da raiz foram selecionados, se também fosse responsivos à auxina e etileno. De acordo com a expressão digital calculada, o ortólogo de milho apresentado nesta invenção é expresso nas raízes sob as condições de estresse de água e nos tecidos relacionados à patogênese. O gene do milho mostra semelhança à nodulina, uma proteína conhecida como estando envolvida durante o desenvolvimento de raiz lateral e nódulo

117

(Papadopoulou et al. Plant Mol Biol. 1996; 30:403-17).

FUE_501 é um transportador de aminoácido putativo de Arabidopsis thaliana que mostra a expressão aumentada sob salinidade, osmótico e também é responsivo ao ácido abscísico (ABA - hormônio de resposta ao estresse abiótico). FUE_51, um homólogo do milho de FUE_501 é composto principalmente pelas seqüências derivadas das seqüências de raiz estressada e possui uma anotação tentativa como um transportador de aminoácido. O ortólogo de sorgo de FUE_51 é envolvido nas respostas de estresse de acordo com a expressão digital. Seu ortólogo de cevada possui seqüências derivadas das raízes e raízes estressadas. Da mesma forma, o ortólogo de trigo mostra diversas seqüências derivadas da raiz.

FUE_502 é um transportador de aminoácido putativo que mostra a expressão aumentada durante o estresse de salinidade e osmótico, nas raízes e nos brotos. FUE_52, seu ortólogo de milho mais próximo, também possui semelhança às proteínas de transporte de aminoácido e possui uma representação significativa das seqüências derivadas de raiz e raiz estressada.

FUE_503 possui uma expressão impressiva nas sementes, sugerindo um forte papel na captação de aminoácidos nas sementes de desenvolvimento. Além do gene ser fortemente regulado de forma ascendente sob salinidade e em resposta ao metil jasmonato. FUE_504 foi escolhido por sua forte resposta a ABA, à salinidade (especialmente do broto), a osmótico e frio. FUE_49 mostra

118

uma forte semelhança no nível dos aminoácidos traduzidos para FUE_504, porém baixa no nível dos nucleotídeos de codificação. Seu ortólogo de sorgo possui seqüências significativamente derivadas do estresse de oscilações de água/seca.

FUE__53 é um transportador de aminoácido putativo com quase todas as seqüências compondo os genes derivados da raiz e especificamente raízes estressadas. Os ortólogos de sorgo, arroz e trigo contêm diversas seqüências derivadas da raiz e raiz sob oscilações de estresse.

FUE_101 e FUE_102 mostram semelhanças aos transportadores de aminoácido. FUE_102 é especificamente composto das seqüências derivadas das mudas tratadas a frio e ponta de orelha do milho infectado por patógeno.

FUE_55 é um gene com uma semelhança notável a isopenteniltransferase de tRNA, uma enzima importante na via metabólica de citocinina. A expressão aumentada de FUE_55 nas raízes ou brotos aumentará os níveis de citocinina levando à expansão aumentada de folha e duplicação de célula, senescência atrasada, resistência aumentada de submersão dos tecidos, utilização otimizada do nitrogênio, etc. FUE_55 é especificamente expresso no endosperma, um tecido que é provavelmente a submersão mais forte na planta.

FUE_505 é um fator de transcrição contendo domínio AP2 putativo presente em duas

listas importantes de genes. Uma lista contém os genes que são responsivos da Zeatina (a Zeatina é uma citocinina naturalmente ocorrente) enquanto a segunda lista de genes contém os genes induzidos por nitrogênio após a adição do nitrogênio às plantas deficientes em nitrogênio (Wang et al., Plant Physiology, June 2003, Vol. 132, pp. 556-567). FUE_505 foi averiguado no agrupamento de ARR (reguladores de resposta de Arabidopsis) que media a resposta do broto à citocinina. A produção de citocinina da raiz aumenta mediante a disponibilidade do nitrogênio (Yamada et al. FEBS Lett. Vol. 436, pp:76-80, 1998). Sua co-regulação junto com ARRs indica um possível papel na resposta de citocinina. É altamente provável que a expressão constitutiva de FUE_505 melhorará a utilização de nitrogênio e crescimento de planta devido à ativação contínua da resposta de citocinina do broto.

EXEMPLO 2

Expressão do mRNA nos polinucleotídios expressos em silício

Os níveis de mRNA são determinados usando o ensaio de transcrição reversa seguido por uma análise de PCR em Tempo Real quantitativa (qRT-PCR). Os níveis de RNA são comparados entre os diferentes tecidos, etapas de desenvolvimento, condições de crescimento e/ou diferentes históricos genéticos. Uma análise de correlação entre os níveis de mRNA em diferentes condições experimentais/históricos genéticos, como prova para o papel do gene na planta.

120

Métodos

Análise de RT-PCR - A raiz e folhas foram cortadas frescas das plantas de milho cultivadas em baldes brancos de 10 litros enchidos com Vermiculita Tamanho 3. Os baldes foram regados com água de torneira até as sementes de um híbrido comercial germinaram. Durante todo o período de crescimento (5 semanas), as plantas foram irrigadas com 2 litros/balde/dias com uma solução pH 5,7 - 5,8 contendo 2mM de $CaCl_2$, 1mM de $MgSO_4$, 1mM de KH_2PO_4, 7mM de KCl e coquetel de micro-elementos. O nitrato de amônia foi adicionado nas seguintes concentrações: 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM, 0,005 mM ou nenhuma. Para os experimentos com o Nitrato de potássio, ao invés do nitrato de amônia, as concentrações eram conforme segue 2mM de $CaCl_2$, 2 mM de $MgSO_4$, 1 mM de KH_2PO_4, 5mM de KCl, e qualquer uma das concentrações de KNO_3: 5mM, 1mM, 0,1 mM, 0,01 mM, mantida em uma concentração final de potássio de 10 mM com concentrações complementares de KCl.

RT-PCR em Tempo Real Quantitativo (qRT-PCR) - Para verificar os níveis de expressão, especificidade e associação de traço, a Transcrição Reversa seguida por PCR em Tempo Real quantitativo (qRTPCR) foi efetuada no RNA total extraído de diversas partes da planta, incluindo, por exemplo, folhas maduras e jovens, raízes e meristemas de raiz, cascas, borlas, sedas, etc. das plantas cultivadas no solo ou vasos sob condições deficientes de nutriente ou ideais conforme acima descrito. O nível do RNA mensageiro (mRNA) são medidos

para todos os genes, previamente previstos de forma bioinformática a ser associado com a Eficiência do uso de fertilizante e correlação entre os níveis de expressão e o status de nutriente da planta foi analisado. O RNA total foi extraído das folhas ou raízes do milho, usando mini-kit de planta RNeasy (Qiagen, Alemanha) usando o protocolo fornecido pelo fabricante. A transcrição reversa foi realizada usando 1,5 µg do RNA total, usando 300 U da enzima de Transcriptase Reversa Super Script II (Invitrogen), 225 ng de hexâmeros de deoxinucleotídeo aleatório (Invitrogen), 500 µM de mistura de dNTPs (Takara, Japão), volume 0,2 de x tampão 5 RT (Invitrogen), 0,01M DTT, 60U de RNAsin (Promega), DDW tratado por DEPC foi adicionado até 37,5 µl. As reações de RT foram incubadas por 50 min. a 42 °C, seguido por 70 °C por 15 min. O cDNA foi diluído em 1:20 em Tris EDTA, pH=8,5mL do cDNA diluído foi usado para qRT-PCR.

O RT-PCR quantitativo foi realizado no cDNA (5 µL), usando x 1 mistura máster SYBR GREEN PCR (Applied Biosystems), iniciadores dianteiros e reversos 0,3 µM cada, e DDW foi adicional até 20 µL. A reação de qPCR foi realizada em uma máquina de PCR em tempo real Stratagene MX 3000 com a seguinte condição 50 °C por 2min, 95 °C por 10min, 40 vezes de 95 °C por 15 seg e 1min a 60 °C, seguido por 95 °C por 15 seg, 60 °C por 60 seg, e 70 vezes de 60 °C por 10 seg + 0,5 °C aumento em cada ciclo. Para cada gene, uma curva padrão é preparada a partir de um pool de RTs de todas as amostras, em 5 diluições (diluições - 1:60, 1:200, 1:600, 1:2000, 1:10000). O gráfico de curva

padrão [ct (limite de ciclo) vs. log (concentração)] deve ter R>=0,98 com uma eficiência na faixa de 100% +/- 5%. Os níveis da expressão (Qty) medida em qPCR foram calculados usando a eficiência (E) da reação de amplificação e CT correspondente (o ciclo em que as amostras cruzaram o limite) $Qty=E^{-C.T.}$. As curvas de dissociação obtidas foram qualificadas para a ausência dos produtos e PCR não específicos ou iniciador-dímeros. As reações foram repetidas pelo menos duas vezes. O método de cálculo é com base na assunção de que as eficiências das reações do GOI (gene de interesse) e dos genes de rotina são semelhantes.

Para normalizar o nível de expressão entre os diferentes tecidos e condições de crescimento das plantas de milho, a expressão de cada gene foi dividida pela média geométrica da expressão dos seguintes quatro genes de rotina: Actina (GenBank Ace N° AY107106), e RPL19 (GenBank Ace. N° AY103679), Ciclofilina (GenBank Ace N° X68678) e fator 1 de Alongamento alfa (EF1A, GenBank Ace N° AF136823).

Tabela 29: Os seguintes iniciadores foram usados para a análise de qRT-PCR:

GENE	INICIADOR/SEQ ID Nº:
INICIADOR DIANTEIRO DE Actina:	CCTGACTGAACGCGGCTACT/SEQ ID Nº:1344
Iniciador Reverso de Actina:	CAATGGTGATGACCTGTCCGT/SEQ ID Nº:1345
Iniciador Dianteiro RPL19:	GGAAAGGCAAAGTCTGGCTTG/SEQ ID Nº:1346
RPL19 Iniciador Reverso:	GCACGGGACCTAGAGTGAACC /SEQ ID Nº:1347
Iniciador Dianteiro de Ciclofilina:	GGACAGCTCTCCTAGATCTCTCTGA/SEQ ID Nº:1348
Iniciador Reverso de Ciclofilina:	CTAAACCGCTAAATTAAACTGCGAG/SEQ ID Nº:1349
Iniciador Dianteiro de EF1A:	GTGAACATGCTCTCCTTGCGT/SEQ ID Nº:1350
Iniciador Reverso de EF1A:	ATTTGGGAGTGGTTGCATCC/SEQ ID Nº:1351
Iniciador Dianteiro de FUE_1:	ACTTCCACTGCGCGTAGATGA/SEQ ID Nº:1352

123

Continuação da tabela 29	
Iniciador Reverso de FUE_1:	ACGGAATAATGACGATGAACCAC/SEQ ID Nº:1353
Iniciador Dianteiro de FUE_2:	CGAGCGACTCAAACCATGC/SEQ ID Nº:1354
Iniciador Reverso de FUE_2:	TCTTGGTGATTGAATCCAGCG/SEQ ID Nº:1355
FUE_2_RT_2F	GCATGGTGGGTAAGGTTTTCTT/SEQ ID Nº:1356
FUE_2_RT_2R	CAATCTTGGTGATTGAATCCAGC/SEQ ID Nº:1357
Iniciador Dianteiro de FUE_3	CACCATCCACGCACTAGTACGT/SEQ ID Nº:1358
Iniciador Reverso de FUE_3	CAGCTAGCCGCTTCGAGAGAT/SEQ ID Nº:1359
Iniciador Dianteiro de FUE_4	AAGACGCCGATCGATACATTG/SEQ ID Nº:1360
Iniciador Reverso de FUE_4	ACGTATTGAGTTCAGTTCTTCATGTGT/SEQ ID Nº:1361
Iniciador Dianteiro de FUE_5	CCATTCAGAGGATATTTGGGTGA/SEQ ID Nº:1362
Iniciador Reverso de FUE_5	AATACTTGCGACCATGTCTATGGA-/8EQ- -ID- NO: 1363
Iniciador Dianteiro de FUE_6	CCAGTCCACAATCTCCCTGCC/SEQ ID Nº:1364
Iniciador Reverso de FUE_6	GTCGTGCGCCTGGCCAAAG/SEQ ID Nº:1365
Iniciador Dianteiro de FUE_7	CTGCGGTCAGAAATCTTATCGTC/SEQ ID Nº:1366
Iniciador Reverso de FUE_7	CGAACACAAAATCAGGCGTCT/SEQ ID Nº:1367
Iniciador Dianteiro de FUE_8	CTTCCGGCTGGGTAAGTTTG/SEQ ID Nº:1368
Iniciador Reverso de FUE_8	ATGGTTCAGTGCCGTCTCCT/SEQ ID Nº:1369
Iniciador Dianteiro de FUE_9	AAGAAGAAGCGACACAGCTCAAC/SEQ ID Nº:1370
Iniciador Reverso de FUE_9	GCAGCAGTAGGATGTGCGATC/SEQ ID Nº:1371
FUE_9_RT_2F	CAGCTCAACTGCTCAAGGACAG/SEQ ID Nº:1372
FUE_9_RT_2R	GGCGCAGCAGTAGGATGTG/SEQ ID Nº:1373
Iniciador Dianteiro de FUE_10	CGATGCCTACAAGAACTACACCG/SEQ ID Nº:1374
Iniciador Reverso de FUE_10	AGTGGTTCTTGTCCGTGTTGAAG/SEQ ID Nº:1375
FUE_10_RT_2F	GCCGATGCCTACAAGAACTACAC/SEQ ID Nº:137 6
FUE_10_RT 2R	TGAAGATGAGGAAATCCCCG/SEQ ID Nº:1377
Iniciador Dianteiro de FUE_12	TCCTGTTACAGATGGCATCCG/SEQ ID Nº:1378
Iniciador Reverso de FUE_12	TCTCTCTCCTTAGTGAAGACGTTCG/SEQ ID Nº:1379
FUE_12_RT_2F	AGAATCTTATAAAGCCCTCACATCGT/SEQ ID Nº:1380
FUE_12_RT 2R	GATGACACGGGCGAACAGTA/SEQ ID Nº:1381
Iniciador Dianteiro de FUE_13	CCGCCACCTTTCCTACGTAC/SEQ ID Nº:1382
Iniciador Reverso de FUE_13	TCGGTCTATACTCGATTCGAAGC/SEQ ID Nº:1383
Iniciador Dianteiro de FUE_14	TCTGTGTTGCTGATATTCACTCTCCT/SEQ ID Nº:1384
Iniciador Reverso de FUE_14	CCTTACTCTTCATGGTGTCTCTAGCTT/SEQ ID Nº:1385
Iniciador Dianteiro de FUE_15	GGCCGCCTGTTAGGAGCTA/SEQ ID Nº:1386
Iniciador Reverso de FUE_15	CGCCTCACTCCTACCTTCATCT/SEQ ID Nº:1387
Iniciador Dianteiro de FUE_16	AAGAGGCAGTGCTGTTTCCGT/SEQ ID Nº:1388
Iniciador Reverso de FUE_16	GCCAGAATCGAGCATAGACCA/SEQ ID Nº:1389
Iniciador Dianteiro de FUE_17	GCATCAAAGAGTGGTCAATTCACA/SEQ ID Nº:1390
Iniciador Reverso de FUE_17	CACCCTCCTTTGCAGTGCA/SEQ ID Nº:1391
Iniciador Dianteiro de FUE_30	CCAAGTCGTCTCTTAGTCCGGA/SEQ ID Nº:1392
Iniciador Reverso de FUE_30	CAGGATGCACGTCTTGCCT/SEQ ID Nº:1393

Continuação da tabela 29	
Iniciador Dianteiro de FUE_31	ATGTGCAACGACCCTACTAACTCC/SEQ ID Nº:1394
Iniciador Reverso de FUE_31	TCAGTGTCCTCAGCGCGAT/SEQ ID Nº:1395
Iniciador Dianteiro de FUE_32	CTCGAGCATCACTCAAACCACTAC/SEQ ID Nº:1396
Iniciador Reverso de FUE_32	GCCAGGCCCATTGAATCAC/SEQ ID Nº:1397
Iniciador Dianteiro de FUE_33	CAGCGCTGTATGGTAAAGGTATTG/SEQ ID Nº:1398
Iniciador Reverso de FUE_33	TGTGTCATGGAGGCTTGCC/SEQ ID Nº:1399
Iniciador Dianteiro de FUE_34	GCCACCAACTCCATTCAACTTT/SEQ ID Nº:1400
Iniciador Reverso de FUE_34	CTCTTATTeATGGGeTTAATTGCA/-SEQ ID Nº:1401
Iniciador Dianteiro de FUE_35	GACGCTCTGATTAGGCTAGGGAC/SEQ ID Nº:1402
Iniciador Reverso de FUE_35	CCCTGCTGTTACGTGGCC/SEQ ID Nº:1403
Iniciador Dianteiro de FUE_36	TCAGTGAAGATGAGGCTCGCTA/SEQ ID Nº:1404
Iniciador Reverso de FUE_36	TCCCATCTAGAAGTGTGTTCTCCA/SEQ ID Nº:1405
Iniciador Dianteiro de FUE_37	TGTGAGCATCAACTCTAACATGGA/SEQ ID Nº:1406
Iniciador Reverso de FUE_37	TGACATAAATTTCACACATTCACATCA/SEQ ID Nº:1407
Iniciador Dianteiro de FUE_38	CTATGGAAATTTGTCACCGTGATC/SEQ ID Nº:1408
Iniciador Reverso de FUE_38	TCGCAAATTTTCACACGAGGT/SEQ ID Nº:1409
Iniciador Dianteiro de FUE_39	CCGATGAGCTAGGAGAAGTGTTG/SEQ ID Nº:1410
Iniciador Reverso de FUE_39	TTTGGCCGATTGGGTATGTC/SEQ ID Nº:1411
Iniciador Dianteiro de FUE_40	ATTGCAGAGAGGGAAAACGTAAGA/SEQ ID Nº:1412
Iniciador Reverso de FUE_40	AAATCAAACACGTCCAAGAACATC/SEQ ID Nº:1413
Iniciador Dianteiro de FUE_41	AAATATTTGTCCTATGGGAATGGG/SEQ ID Nº:1414
Iniciador Reverso de FUE_41	AGTATAATAGTTCTGTCCAAAGTTGCGT/SEQ ID Nº:1415
Iniciador Dianteiro de FUE_42	GGTTGCGCGCTCTGACTTA/SEQ ID Nº:1416
Iniciador Reverso de FUE_42	CCAACGACTCGCCTTCCTAAC/SEQ ID Nº:1417
Iniciador Dianteiro de FUE_43	CTTTGTAAACCAATGCCATCAGTTAG/SEQ ID Nº:1418
Iniciador Reverso de FUE_43	GCTGGACTCTCTTCACTTCGCT/SEQ ID Nº:1419
Iniciador Dianteiro de FUE_44	GCACTGATCAATGCCGACTG/SEQ ID Nº:1420
Iniciador Reverso de FUE_44	AAGGATTGGATCGGATACTTGTAGA/SEQ ID Nº:1421
Iniciador Dianteiro de FUE_45	TTATCCATGATACCCCGCTGA/SEQ ID Nº:1422
Iniciador Reverso de FUE_45	GTGCTTGTTGACTTGACGACG/SEQ ID Nº:1423
Iniciador Dianteiro de FUE_46	AGCAGCCGCTGTGTATAACAAG/SEQ ID Nº:1424
Iniciador Reverso de FUE_46	GGAAGGGAAAGAGGACGTCAA/SEQ ID Nº:1425
Iniciador Dianteiro de FUE_47	TGAACCTACTCTTTGGGATAGCTGT/SEQ ID Nº:1426
Iniciador Reverso de FUE_47	ACGTGGAGAATTACATGCTGATAGTT/SEQ ID Nº:1427
Iniciador Dianteiro de FUE_48	ACCATTGTTAGTGACTTAATTACCCTCA/SEQ ID Nº:1428
Iniciador Reverso de FUE_48	CGAAATCGATAGACCACACACG/SEQ ID Nº:1429
Iniciador Dianteiro de FUE_49	CCCTTCTACAAGCAAATACTCACTCC/SEQ ID Nº:1430
Iniciador Reverso de FUE_49	GACCCTCTCATCTCTTATTGAACCA/SEQ ID Nº:1431 '
Iniciador Dianteiro de FUE_50	GGCGATCCAACGGAGAAGTAG/SEQ ID Nº:1432
Iniciador Reverso de FUE_50	ACATCGGCAGCACGGAGT/SEQ ID Nº:1433
Iniciador Dianteiro de FUE_51	CCGGTGCATAAGGAAATACGAG/SEQ ID Nº:1434

125

Continuação da tabela 29	
Iniciador Reverso de FUE_51	GACAGATTGAAAACTGCCCCAG/SEQ ID Nº:1435
Iniciador Dianteiro de FUE_52	GTCGATCATCGCATTCTCCA/SEQ ID Nº:1436
Iniciador Reverso de FUE_52	TCCTTTCATCGTATCCCCCAT/SEQ ID NO": 1437
Iniciador Dianteiro de FUE_53	CAGATCTTCTTCTCTCAGCTCCCT/SEQ ID Nº:1438
Iniciador Reverso de FUE_53	GGGCTGAATCAACGTCGACT/SEQ ID Nº:1439
Iniciador Dianteiro de FUE_54	GAAGCTGTGGGTCTCAAGGG/SEQ ID Nº:1440
Iniciador Reverso de FUE_54	AGGTCGGCACGTACTCGG/SEQ ID Nº:1441
Iniciador Dianteiro de FUE_55	TCTACATCCAGGCTCTCGTTAGC/SEQ ID Nº:1442
Iniciador Reverso de FUE_55	TTCATCTTCATCAGTAAGACCATCATC/SEQ ID Nº:14 43

Resultados

A análise de RT-PCR em Tempo Real forneceu comprovação de que as seqüências selecionadas em silício de polinucleotídio são, de fato, associadas com o Uso de Nitrogênio. Embora a maioria dos genes tenha sido escolhida devido a sua associação com a seca, os genes foram averiguados como responsivos ao status do Nitrogênio dentro da planta, sugerindo uma diafonia entre o estresse da deficiência de nutriente e seca. A comprovação de que o painel de RNA usado nesse ensaio não reflete as alterações genuínas associadas ao status do nitrogênio pode ser encontradas nas Figuras 3A-D, em que os genes conhecidos associados à captação e assimilação do nitrogênio mostram as alterações em seus níveis de expressão de acordo com o nível do fertilizante de nitrogênio usado na solução de irrigação. Os gráficos representam os níveis normalizados de expressão encontrados para cada gene, divididos pelo nível de expressão na concentração mais alta do fertilizante de nitrogênio usada na solução de irrigação. As Figuras 3A e 3B mostram os resultados encontrados para dois transportadores de nitrato de alta afinidade e de amônia, respectivamente. Conforme esperado, em concentrações mais altas do substrato,

a expressão dos transportadores de alta afinidade é regulada de forma descendente. De forma oposta, esses transportadores de alta afinidade, obviamente essenciais nas condições em que o substrato é escasso, são regulados de forma ascendente em baixas concentrações de nitrato e amônia (vide Figura 3A e 3B). Conforme esperado para duas enzimas chave na via de assimilação do nitrogênio, tal como, Sintase de Glumamina 1C e Sintase de Glumamina 2, sua expressão é regulada de forma ascendente sob altas condições de substrato, conforme mostrado na Figura 3C e 3D, respectivamente. Tipicamente, os transportadores de baixa afinidade são regulados de forma ascendente com alta concentração do N. De forma oposta, os transportadores de alta afinidade são regulados de forma ascendente com baixa concentração do N. As enzimas envolvidas na assimilação do N (a conversão de n para aminoácidos) são reguladas de forma ascendente na presença de nitrogênio. Os genes identificados no Exemplo 1 mostram o comportamento responsivo distinto do nitrogênio averiguado para os genes de controle (Figuras 3 A-D). FUE_3 (conforme mostrado na Figura 4A) mostram a regulação de forma ascendente em altas concentrações de substrato conforme averiguado para as enzimas de assimilação de controle chave indicando uma clara associação desse gene com o status de nitrogênio da planta e, assim, sua relação às respostas relacionadas do nitrogênio. A mesma regulação de forma ascendente encontrada para FUE_3 foi encontrada para diversos outros genes incluídos no Exemplo 1, tal como, FUE_12 (conforme mostrado na Figura 4B), FUE_30 (conforme

mostrado na Figura 4C), FUE_33 (conforme mostrado na Figura 4D), FUE_34 (conforme mostrado na Figura 4E), FUE_38 (conforme mostrado na Figura 4F), FUE_43 (conforme mostrado na Figura 4G), FUE47 (conforme mostrado na Figura 4H), FUE_48 (conforme mostrado na Figura 41), FUE_49 (conforme mostrado na Figura 4J) e FUE_52 (conforme mostrado na Figura 4K).

Então novamente, incluídos no Exemplo 1 estão os genes que mostram uma regulação de forma ascendente firme quando o fertilizante do nitrogênio estiver com pouco abastecimento. Esse tipo de genes é esperado para estar relacionado às vias envolvidas na assimilação do nitrogênio, armazenamento e uso sob condições de deficiência de nitrogênio, conforme no caso dos transportadores de nitrato e amônia de alta afinidade (Figuras 2C e 2D). A Figura 5A mostra os resultados para FUE_4, um gene que passa por uma forte regulação de forma ascendente em baixa disponibilidade do fertilizante de nitrogênio, indicando um papel claro desse gene na resposta endógena da planta para as condições deficientes de nitrogênio. Da mesma forma, os outros genes no Exemplo 1, exibem uma curva de sensibilidade ao nitrogênio semelhante, conforme FUE_4, tal como FUE_10 (conforme mostrado na Figura 5B), FUE_37 (conforme mostrado na Figura 5C), FUE46 (conforme mostrado na Figura 5D) e FUE_50 (conforme mostrado na Figura 5E).

Considerados juntos, os resultados aqui apresentados claramente implicam uma correlação próxima entre os genes selecionados em silício e

as vias associadas do nitrogênio.

EXEMPLO 3

Clonagem de gene e criação de vetores binários para expressão da planta

Estratégia de clonagem

Vinte e oito genes dos 50 genes selecionados no Exemplo 1 e validados no Exemplo 2 acima foram clonados em vetores binários para a geração das plantas transgênicas. Para clonagem, a estrutura de leitura aberta de comprimento total (ORF) foi primeiro identificada.

Os agrupamentos de EST e, em alguns casos, as seqüências de mRNA, foram analisados para identificar toda a estrutura de leitura aberta ao comparar os resultados de diversos algoritmos de tradução com as proteínas conhecidas de outras espécies de planta. No caso em que toda a seqüência de codificação não foi encontrada, os kits de RACE da Ambion ou Clontech (RACE = Rápido Acesso às Extremidades de cDNA) foram usados para preparar o RNA das amostras de planta descrita no Exemplo 2 acima, de modo a assim acessar toda a transcrição de cDNA do gene.

Com a finalidade de clonar os cDNAs de comprimento total, a Transcrição Reversa seguida por PCR (RT-PCR) foi realizada sobre o RNA total extraído das folhas, raízes ou outros tecidos de planta, cultivados sob condições normais ou deficientes de nutriente. A extração total do RNA, produção de cDNA e amplificação de PCR foram realizadas usando os protocolos padrão descrito em qualquer local (Sambrook J., E.F. Fritsch, e T. Maniatis.

1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual., 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) e são básicos para aqueles com habilidade na técnica. Os produtos de PCR foram purificados usando o kit de purificação de PCR (Qiagen) e o seqüenciamento dos produtos de PCR amplificados é realizado, usando o seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

Para facilitar a clonagem dos cDNAs, uma extensão de 8-12 bp foi adicionada à extremidade primitiva 5' de cada iniciador. A extensão do iniciador inclui um local de restrição de endonuclease. Os locais de restrição são selecionados usando dois parâmetros: a. O local não existe na seqüência de cDNA, b. Os locais de restrição nos iniciadores dianteiros e reversos são projetados de modo que o cDNA digerido seja inserido na formação de senso no vetor binário utilizado para transformação. Por exemplo, o vetor de plasmídio pPI foi construído ao inserir uma seqüência sintética de sinal poli-(A), originando do vetor de plasmídio básico pGL3 (Promega, Ace. N° U47295; bp 4658-4811) no local de restrição HindIII do vetor binário pBI101.3 (Clontech, Ace. N° U12640).

Os produtos de PCR foram purificados (Kit de Purificação de PCR, Qiagen, Alemanha) e digeridos com os locais de restrição de acordo com os iniciadores usados (Roche, Suíça). Os produtos de PCR digeridos foram clonados no vetor binário pPI, que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. O produto de PCR digerido e o vetor linearizado de plasmídio foram

130

ligados usando enzima de ligase de T4 DNA (Roche, Suíça). Os seguintes genes foram clonados a partir do RNA extraído dos tecidos descritos acima usando os seguintes iniciadores:

Tabela 30 - genes clonados das oscilações de cDNA e os iniciadores usados para a clonagem

Nome do Gene	Enzimas de Restrição usadas para clonagem	Iniciadores usados para amplificação/SEQ ID Nº:
FUE_501	SmaI, EcoRV	Fwd-AACCCGGGAACAATGACACCACAGATCAAAACTCA/SEQ ID Nº:1444
		Rev-AGGATATCATATGAATGCTACGGCAAGC/SEQ ID Nº:1445
FUE_502	SmaI, SacI	Fwd- AAACCCGGGAACAATGAGGTACGATCAGGAAGCGG /SEQ ID-NO: 1446
		Rev –TTGAGCTCGTTCGCTGGAGGTAACAATG /SEQ ID Nº:1447
FUE_503	SmaI, EcoRV	Fwd- AACCCGGGAACAATGGATCAAAAAGTTAGACAGTT/SEQ ID Nº:1448
		Rev- TTGATATCCACAAAACTCTCTAGCTCCTGAC/SEQ ID Nº:14 49
FUE_504	SmaI, SacI	Fwd-AAACCCGGGAACAATGGAGGACAAGAACAATGATAAG/SEQ ID Nº:1450
		Rev-TTGAGCTCGGGTCTCTTTGTCATGGAGTTC/SEQ ID Nº:1451
FUE_33	SmaI, SacI	Fwd- CTCCCGGGAACAATGGCTCTCGTGACCTCGG/SEQ ID Nº:1452
		Rev- TTGAGCTCCGCAACACAGTTTCATGACCA /SEQ ID Nº:1453
FUE_34_Evo	SmaI, EcoRV	Fwd- GGTCTAGAAACAATGGGGAGGGGAAAGAT/SEQ ID Nº:1454
		Rev-CGGGATATCATAAGACGCCAGTTTTACTCTTATTCATGGGC/SEQ ID Nº:1455
FUE_34_Pat	SmaI, EcoRV	Fwd- GGTCTAGAAACAATGGGGAGGGGAAAGAT/SEQ ID Nº:1456
		Rev-CGGGATATCATAAGACGCCAGTTTTACTCTTATTCATGGGC/SEQ ID Nº:1457
FUE_39	SmaI, SacI	Fwd - AATCTAGAATGGTGGACTTTGTTCGACGG/SEQ ID Nº:1458
		Rev - CTGAGCTCACAGGAGGACATGCCACC/SEQ ID Nº:1459
FUE_43	SmaI, SacI	Fwd- CATCTAGAAACAATGGCGGACTCGTCGGCG/SEQ ID Nº:1460
		Rev- TTGAGCTCGCAGTGTGCAAGAGTTCCCTC/SEQ ID Nº:1461
FUE_50	SmaI, EcoRV	Fwd- AATCTAGAGTAATAAGCCAACAAACAAACCG/SEQ ID Nº:1462
		Rev- CAGATATCCTAGCATACCGACCCTGAAAACAC/SEQ ID Nº:1463

As seqüências sintéticas de alguns dos polinucleotídeos clonados foram pedidas de um fornecedor comercial (GeneArt, GmbH). O DNA sintético foi projetado em silício, com base nas seqüências de polipeptídio codificadas putativas descritas no Exemplo 1.

131

Para otimizar a seqüência de codificação, as tabelas de utilização de códon calculadas a partir dos transcriptomes de planta foram usadas (o exemplo de tais tabelas pode ser averiguado no Banco de Dados de Utilização de Códon disponível on-line em http://www.kazusa.ou.jp/codon/). As seqüências otimizadas de codificação foram projetadas de uma forma que nenhuma alteração é introduzida na seqüência codificada de aminoácido enquanto usando os códons preferidos para expressão nas plantas dicotiledôneas, principalmente tomate e Arabidopsis; e as plantas monodicotiledônea, tais como o milho. Tais seqüências otimizadas promovem a melhor taxa de tradução e, portanto, níveis mais altos de expressão da proteína. Para as seqüências otimizadas, os locais de enzima únicos adicionais laterais foram adicionados - SalI, XbaI, BamHI, SmaI na extremidade 5' e SacI na extremidade 3'. Os genes para os quais as seqüências sintéticas otimizadas de códon foram preparados são:

FUE_2 (SEQ ID N°: 1317), FUE_3, (SEQ ID N°: 1319) FUE_4 (SEQ ID N°: 1320), FUE_40 (SEQ ID N°: 1321), FUE_7 (SEQ ID N°: 1322), FUE_8 (SEQ ID N°: 1324), FUE_9 (SEQ ID N°: 1325), FUE_10 (SEQ ID N°: 1326), FUE_12 (SEQ ID N°: 1327), FUE_13 (SEQ ID N°: 1328), FUE_14 (SEQ ID N°: 1329), FUE_16 (SEQ ID N°: 1330), FUE_37 (SEQ ID N°: 1331), FUE_41 (SEQ ID N°: 1332), FUE_46 (SEQ ID N°: 1333), FUE_47 (SEQ ID N°: 1334), FUE_49 (SEQ ID N°: 1335), FUE_52 (SEQ ID N°: 1336).

Duas seqüências não otimizadas,

designadas como "FUE_2_Original" (SEQ ID N°: 1318) e "FUE_7_Original" (SEQ ID N°: 1323), idênticas às suas seqüências de milho endógeno foram sintetizadas e clonadas para expressão em excesso na criação da planta transgênica.

Geração dos vetores binários compreendendo genes FUE e promotores funcionais da planta para acionar sua expressão - O plasmídio pPI foi construído ao inserir uma seqüência sintética de sinal poli-(A), originando do vetor básico de plasmídio pGL3 (Promega, Ace N° U47295; bp 4658-4811) no local de restrição HindIII do vetor binário pBI101.3 (Clontech, Ace. N° U12640). Em alguns casos, o plasmídio binário de suporte usado foi o pGI, que é semelhante ao pPI, porém o gene GUS foi substituído pelo gene GUS-Intron (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990). O pGI foi usado para clonar todas as seqüências de polinucleotídio, inicialmente sob o controle do promotor 35S [Odell, JT, et al. Nature 313, 810 - 812 (28 February 1985); SEQ ID N°: 1337].

Algumas seqüências de polinucleotídio foram clonadas de acordo com outros promotores preferenciais conforme abaixo descrito. Um dos promotores, aqui nomeado "RootP" (SEQ ID N°: 1338), devido a sua expressão enriquecida nas raízes, foi amplificado e clonado a partir do DNA genômico isolado de Arabidopsis thaliana por PCR direto usando os seguintes iniciadores.

Tabela 31

Nome do Iniciador	Seqüência de Iniciador/SEQ ID N°:
Raiz_P Dianteira (Enzima SalI)	TATGTCGACTCAGATGAAGAAGGCGGCT/SEQ ID N°:1464
RootP Reversa (Enzima SmaI)	GTCCCGGGTTTATTAGATCTCTCTAGGAGTTTTGA/SEQ ID N°:14 65

O promotor é a região a montante 1110 bp do gene ATXTH19 (AT4G30290, Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 19). A seqüência clonada já foi mostrada para acionar a expressão específica da raiz (Vissenberg K, et al. Plant Cell Physiol. 2005 Jan;46(1): 192-200). Os seguintes genes foram clonados a montante da seqüência de promotor RootP: FUE_3, FUE_4, FUE_8, FUE_9, FUE13, FUE_14, FUE16, FUE_33, FUE_34_Evo. Para fins de controle, a enzima de β-glucuronidase (GUS) codificada pelo gene uid A (ACESSÃO DE GENBANK N°: S69414).

O promotor TT105 (SEQ ID N°: 1339; 2004/081173) foi usado para medir a expressão ubíqua constitutiva em níveis diferentes daqueles mediados pelo promotor 35S. O promotor TT105 contém a região a montante do gene ELP (deposição ectópica de Lignina, ACESSÃO DE GENBANK N°: NM_100466, AT1G05850) incluindo o primeiro exon e parte do primeiro intron. Os genes clonados de acordo com o promotor TT105 foram FUE_502, FUE_504, FUE_39 e FUE_52. Novamente, a enzima β-glucuronidase (GUS) codificada pelo gene uid A foi clonada de acordo com o promotor TT105.

EXEMPLO 4

Geração das plantas transgênicas expressando os genes FUE

Materiais e Métodos

Transformação de Arabidoposis - foi efetuada de acordo com Clough SJ, Bent AF. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. 16(6): 735-

134

43; e Desfeux C, Clough SJ, Bent AF. (20000 Female reproductive tissues are the primary targets of Agrobacterium-mediated transformação by the Arabidopsis floral-dip method. Plant Physiol. 123(3): 895-904.). Brevemente, Arabidopsis thaliana var Columbia (plantas T_0) foi transformada usando o procedimento de Imersão Floral descrito por Clough SJ e Bent AF (10) e por Desfeux C et al. (11), com modificações menores. Brevemente, as Plantas T_0 de Arabidopsis thaliana Columbia (Col0) foram semeadas em potes de 250 ml enchidos com mistura de crescimento com base em turfa úmida. Os vasos foram cobertos com chapas de alumínio e um domo de plástico, mantidos a 4 °C por 3-4 dias, então descobertos e incubados em uma câmara de crescimento em 18-24 °C sob 16/8 h de ciclos de dia/noite. As Plantas T_0 estavam prontas para transformação seis dias antes da florescência. As únicas colônias de Agrobacterium transportando os vetores binários abrigando os genes FUE foram cultivadas no meio LB complementado com kanamicina (50 mg/L) e gentamicina (50 mg/L). As culturas foram incubadas em 28 °C por 48 h sob agitação vigorosa e centrifugadas em 4000 rpm por 5 minutos. Os grânulos compreendendo as células de Agrobacterium foram suspensos novamente em um meio de transformação que continha Murashige-Skoog (Duchefa) de semi-resistência (2,15 g/L); 0,044 πM de benzilaminopurina (Sigma); 112 πg/L de vitaminas B5 Gambourg (Sigma); 5 % de sacarose; e 0,2 ml/L de Silwet L-77 (OSI Specialists, CT) em água destilada dupla, no pH de 5,7.

A transformação das Plantas T_0

foi realizada ao inverter cada planta em uma suspensão de Agrobacterium, de modo que o talo da floração foi submerso para 3-5 segundos. Cada Planta T_0 inoculada foi imediatamente colocada em uma bandeja de plástico, então coberta com domo de plástico transparente para manter a umidade e manter no escuro em temperatura ambiente por 18 h para facilitar a infecção e transformação. As plantas transformadas (transgênicas) são então descobertas e transferidas a uma estufa para recuperação e maduração. As Plantas T_0 transgênicas foram cultivadas na estufa por 3-5 semanas até as síliquas ficarem marrons e secas, então as sementes foram colhidas das plantas e mantidas em temperatura ambiental até semeadura.

Para gerar as plantas transgênicas T1 e T_2 acolhendo os genes, as sementes coletadas das plantas transgênicas T_0 foram esterilizadas na superfície ao encharcar em 70 % de etanol por 1 minuto, seguindo por encharcar em 5 % de hipoclorito de sódio e 0,05 % de Tritão X-100 por 5 minutos. As sementes esterilizadas na superfície foram totalmente lavadas em água destilada estéril então colocadas nas placas de cultura contendo Murashige-Skoog de semi-resistência (Duchefa); 2 % de sacarose; 0,8 % de ágar da planta; 50 mM de kanamicina; e 200 mM de carbenicilina (Duchefa). As placas de cultura foram incubadas em 4 °C por 48 horas, então transferidas a uma sala de crescimento em 25 °C por uma semana adicional de incubação. As plantas T_1 vitais de Arabidopsis foram transferidas às placas frescas de cultura por outra semana

de incubação. Após a incubação, as plantas T_1 foram removidas das placas de cultura e plantadas em mistura de crescimento contida em vasos de 250 ml. As plantas transgênicas foram permitidas a crescer em uma estufa para maturidade. As sementes colhidas das plantas T_1 foram cultivadas e crescidas para maturidade como plantas T_2 sob as mesmas condições que usadas para cultivação e crescimento das plantas T_1. Pelo menos 10 eventos independentes de transformação foram criados a partir de cada construção para a qual o volume das sementes T2 foram coletadas.

Transformação do Milho - Esse procedimento é realizado de acordo com (Bronwyn R. Frame, et al, Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System, Plant Physiology, May 2002, Vol.129, pp. 13-22) ou com diversos protocolos disponíveis em qualquer local na Dependência de Transformação de Planta na Universidade Estadual de Iowa (http://www.agron.iastate.edu/ptf/Web/mainframe.htm).

EXEMPLO 5

Seleção das plantas transgênicas de Arabidopsis expressando os genes FUE de acordo com o nível de expressão

Materiais e Métodos

As plantas transgênicas foram cultivadas conforme detalhado no Exemplo 4 acima. O RNA total foi extraído a partir de 10 flores recentemente cortadas das plantas transgênicas conforme detalhado no Exemplo 2 acima. Com a finalidade de determinar o nível de

expressão relativo do transgene, as reações de qRT-PCR foram realizadas conforme descrito no Exemplo 2 acima e os resultados foram normalizados contra a média geométrica da expressão de dois genes de rotina medidas nas mesmas amostras.

Tabela 31 - Iniciadores usados para a seleção das plantas transgênicas

NOME DO INICIADOR	SEQÜÊNCIA DO INICIADOR / SEQ ID Nº:
NUE10 RT F	CCACTCTGTGGTTCAGACTAGGAAC/SEQ ID Nº:1466
NUE10 RT R	CATTCAACAGTATCATCTGGCCC/SEQ ID Nº:1467
NUE16 RT F	CAGGATGGTCTAGTGGAGTGGAT/SEQ ID Nº:1468
NUE16 RT R	GCAGAGTACTGGAACACAAGGTTATC/SEQ ID Nº:14 69
NUE41 RT F	CGTAAGAGAGTGGGACTTACTGGAT/SEQ ID Nº:1470
NUE41 RT R	CCATGCCTATCAGAGTACCTGTGA/SEQ ID Nº:1471
FUE501 RT F	GTCCTGCGTAGACGAGTCGAA/SEQ ID Nº:1472
FUE501 RT R	AGCTTATGACAACAAATAGAACCGC/SEQ ID Nº: 1473
NUE50 RT F	GCCACCATTGTACTCGTCCC/SEQ ID Nº:1474
NUE50 RT R	GAAGCCCGTCAGTCCAAGG/SEQ ID Nº:1475
NUE50 RT2 F	CCAGTGCATGTACTACCAAGGG/SEQ ID Nº:1476
NUE50 RT2 R	CTAGGCCGACTGATGCCG/SEQ ID Nº:1477
FUE501 RT2 F	ACTTACGCCGGAGTTATGAAAGAG/SEQ ID Nº:1478
FUE501 RT2 R	AAAAGTAGCAACCATCGTAGCAATC/SEQ ID Nº:1479
FUE502 RT 751F	CTAGAGGCTAAATACAAAGACAAGTTCG/SEQ ID Nº:1480
FUE502 RT 831R	GAACGCACCGTACATGATCG/SEQ ID Nº:1481
FUE503 RT 349F	TTATCTTTATCTACTGGTGCGTTATTGC/SEQ ID Nº:1482
FUE503 RT 430R	ACGTCGAATGAGGCTTACACG/SEQ ID Nº:1483
FUE 504 RT 296F	CCAGCAGAAGTAATTTAGATGTTGAGTC/SEQ ID Nº:1484
FUE 504 RT 431R	CCACCAATGGGCAATTCC/SEQ ID Nº:1485
NUE39 RT2 f	GATAAGGAGGAATGGCGCAG/SEQ ID Nº:1486
NUE39 RT2 R	GCATCCTCTACTTGAGAGTTGAACAC/SEQ ID Nº:1487
NUE3 RT F	CAACTTACTCCATGCGCTGGT/SEQ ID Nº:1488
NUE3 RT R	GGCTGTTGTTCCTTAAGCCTAGAG/SEQ ID Nº:1489
NUE4 RT F	ATGTTGTTTGGCCAGCAGGT/SEQ ID Nº:1490
NUE4 RT R	AAGTGGAACAGCGTGTGCTCT/SEQ ID Nº:1491
NUE4 9 RT F	CCACAATCTTACCGTGAGACCA/SEQ ID Nº:14 92
NUE4 9 RT R	GTACTTAGAGGTAGATGACCCGAGGT/SEP. .ID_ _NO:14 93 .
NUE13 RT F	TGAGAGAATGTGGAAGGTTGCAT/SEQ ID Nº:1494
NUE13 RT R	TCATGGTAGTCACAGATCCTGGTC/SEQ ID Nº:1495

Continuação da tabela 31	
NUE2-Original F	AGTGTTCGTCCTCCCAGCAC/SEQ ID Nº:1496
NUE2-Original R	CCTGCCTTTTCTGGATGTCAAC/SEQ ID Nº:14 97
NUE7 RT F	TTCTCAACAGGGTGATGATGCT/SEQ ID Nº:1498
NUE7 RT R	GTCTGAACAGTCTTGGTAACAGTCTCTT/SEQ ID Nº:1499
NUE7 Original RT F	TTGTGTTGGGCGTGAGCA/SEQ ID Nº:1500
NUE7 Original RT R	GGGAGGTGGAAGCAAGGC/SEQ ID Nº:1501
NUE9 RT F	AATGGCTTTCGAGGGACCA/SEQ ID Nº:1502
NUE9 RT R	GGAGAACAAAGTAGATCTGCCCA/SEQ ID Nº:1503
G3PD RT F	CCTTGACATTGTTTCCAACGCTA/SEQ ID Nº:1504
G3PD RT R	GACAGTGGTCATGAGTCCCTCA/SEQ ID Nº:1505
UBQ4 RT F	CTTCTGAGCTTTTGTGATGTGATCA/SEQ ID Nº:1506
UBQ4 RT R	ATAAGTTTTTCCCGCAGACCG/SEQ ID Nº:1507
NUE52 RT F	AGCCAAAGACCTTCGCTAACG/SEQ ID Nº:1508
NUE52 RT R	CCAGTCCTAGAGAAAGTGTATGGGA/SEQ ID Nº:1509
GUS RT2 F	GTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG/SEQ ID Nº:1510
GUS RT2 R	AATAACATACGGCGTGACATCG/SEQ ID Nº:1511

Resultados

Cerca de doze eventos transgênicos foram passados por triagem para cada construção. Os resultados foram altamente repetitivos e mostraram que, dentro de 10 eventos aleatórios de transformação, cerca de 20 a 40 diferenças de dobra na expressão transgene foram encontradas. Os exemplos representativos de tais achados são mostrados nas Tabelas 32, 33 e 34). Com base nesses achados, cerca de 5 eventos diferentes mostrando os níveis de expressão mais altos do que a média, foram obtidos para a validação adicional da função do gene (vide Exemplos 6 - 9).

Tabela 32

Resultados encontrados para NUE 43	Nível de Expressão Normalizado	Nível de expressão relativo ao nível mais baixo de expressão averiguado
FUE_43 Evento 1	0,1503277	1
FUE_43 Evento 2	0,16169295	1,075603188
FUE_43 Evento 3	0,48948083	3,256092124

Continuação da tabela 32		
FUE_43 Evento 4	0,62021826	4,12577504
FUE_43 Evento 5	0,65818337	4,378324085
FUE_43 Evento 6	0,66609819	4,430974496
FUE_43 Evento 7	0,77390675	5,148131499
FUE_43 Evento 8	0,88588004	5,892992865
FUE_43 Evento 9	1,47644781	9,821528908
FUE_43 Evento 10	3,35576541	22,32300168

Tabela 33

Resultados encontrados para NUE 49	Nivel de Expressão Normalizada	Nivel de expressão relativo ao nivel mais baixo de expressão averiguado
FUE_49 Evento 1	0,284411514	1
FUE_49 Evento 2	0,40568304	1,426394573
FUE_49 Evento 3	0,523973448	1,842307439
FUE_49 Evento 4	0,606977918	2,134153816
FOE_49 Evento 5	0,747036597	2,626604621
FUE_49 Evento 6	0,763272592	2,6836909
FUE_49 Evento 7	1,057302538	3,717509615
FUE_49 Evento 8	1,28937008	4,533466532
FUE_49 Evento 9	1,572327678	5,528354517
FUE_49 Evento 10	1,750374095	6,154371426
FUE_49 Evento 11	4,491236228	15,79133054
FUE_49 Evento 12	10,44746677	36,73362806

Tabela 34

Resultados encontrados para NUE 16	Nivel de Expressão Normalizada	Nivel de expressão relativo ao nivel mais baixo de expressão averiguado
FUE_16 Evento 1	0,143683	1
FUE_16 Evento 2	0,884513	6,156021
FUE_16 Evento 3	0,975626	6,790146
FUE_16 Evento 4	1,05558	7,346604
FUE_16 Evento 5	1,296067	9,020344
FUE_16 Evento 6	1,550371	10,79025
FUE_16 Evento 7	2,161574	15,04409
FUE_16 Evento 8	2,918563	20,31257
FUE_16 Evento 9	3,126949	21,76289
FUE_16 Evento 10	3,149679	21,92108
FUE_16 Evento 11	5,041681	35,089

140

EXEMPLO 6

Eficiência melhorada do uso de fertilizante no ensaio da cultura de tecido

Materiais e Métodos

Ensaio 1: Ensaio de eficiência do uso de nitrogênio usando plantinhas - O ensaio foi realizado de acordo com Yanagisawa-S. et al. com modificações menores ("Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 7833-7838).

As plantas transgênicas que foram cultivadas por 7-10 dias em 0,5 x MS [Murashige-Skoog] complementadas com um agente de seleção foram transferidas para duas condições limitantes de nitrogênio: meio MS em que a concentração combinada de nitrogênio (NH_4NO_3 e KNO_3) era de 0,2 mM ou 0,05 mM. As plantas foram permitidas a crescer por 30-40 dias adicionais e então fotografadas, individualmente removidas do ágar (o broto sem as raízes) e imediatamente pesadas (peso recente) para análise estatística posterior. As construções para as quais somente as sementes T1 estavam disponíveis no meio seletivo e pelo menos 25 mudas (cada uma representando um evento independente de transformação) foram cuidadosamente transferidas ao meio limitante de nitrogênio. Para as construções que as sementes T2 estavam disponíveis, diferentes eventos de transformação foram analisados. Normalmente, as plantas aleatoriamente selecionadas de cada evento foram transferidas ao meio limitante de nitrogênio

permitida para crescer por 3-4 semanas adicionais e individualmente pesadas no final de tal período. As plantas transgênicas foram comparadas para controlar as plantas cultivadas em paralelo sob as mesmas condições. As plantas transgênicas de imitação expressando o gene repórter uidA (GUS) sob o mesmo promotor foram usadas como controle.

Análise estatística - Para identificar os genes que conferem a eficiência significativamente melhorada do uso de nitrogênio (ou tolerância aos estresses abióticos ou arquiteturas ampliadas de raiz, vide abaixo), os resultados obtidos das plantas transgênicas foram comparados aos obtidos das plantas de controle. Os dados de área de planta, dados de peso da semente e dados de peso de planta, foram analisados ANOVA unilateral. Para identificar os genes e construções de sobre-realização, os resultados dos eventos independentes de transformação testados foram analisados separadamente. Além disso, os genes e construções também foram analisados considerando os resultados obtidos de todos os eventos independentes de transformação testados da construção específica. Para a análise do gene versus controle, o teste Student t ou teste Tukey HSD foi aplicado, usando a significância de $p<0,05$. O pacote de software de estatísticas de JMP foi usado (Versão 5.2.1, SAS Institute Inc., Gary, NC, USA). A mesma análise estatística foi usada nos Exemplos 6-9 que segue.

Resultados

As seqüências de

polinucleotídio da presente invenção foram ensaiadas por um número de traços comercialmente desejados.

A Figura 7 mostra a capacidade de FUE_504 ou FUE39 para melhorar NUE das plantas transgênicas expressando os mesmos. Claramente, as plantas transgênicas crescidas no nitrogênio são maiores e mais pesadas do que as plantas de controle expressando um gene de controle sob o mesmo promotor usado para expressar os transgenes. Para verificar que o aumento na massa atingido pelas plantas transgênicas é estatisticamente significativo, as plantas foram individualmente pesadas e os resultados de toda a população dos eventos analisados. Conforme mostrado na Tabela 35 abaixo, as plantas transgênicas expressando FUE_504 são significativamente mais pesadas do que as contrapartes de controle. Os resultados demonstram uma melhoria em NUE, considerando que as plantas transgênicas expressando o FUE_504 são capazes de produzir significativamente mais biomassa do que as plantas de controle com início a partir de um meio deficiente semelhante de nitrogênio.

Tabela 35

Nitrogênio conc.		Peso Médio Quadrado Menor (mg)	Erro Padrão
0,2 mM	Candidato 1	5,5185185*	0,3626
0,2 mM	Controle	3,032	0,3769
*os resultados são significativamente diferentes a = 0,05			

Notavelmente, sempre que as plantas T1 forem usadas para ensaiar o efeito de FUE_504; portanto, cada planta testada é um resultado de um evento

diferente de transformação. Tendo isso em mente, é claro que o efeito averiguado para plantas T1 é em decorrência do transgene que não é associado com o local de integração do transgene.

Quando as plantas de T2 foram ensaiadas, os resultados foram passíveis de reprodução no caso em que três transformações independentes aumentaram o peso recente eram evidentes sob as condições limitantes de nitrogênio. Os resultados semelhantes foram obtidos para FUE_39 e FUE_52. Conforme mostrado na Tabela 36 abaixo, três eventos transgênicos independentes contribuíram com o aumento da biomassa de plantinha de acordo com condições limitantes de nitrogênio. Os resultados indicam que a expressão de FUE_39 e FUE_502, da mesma forma, induzem uma melhoria significativa na eficiência do uso de nitrogênio.

Tabela 36: Média de quadrado menor do peso recente medido a partir de ~25 plantinhas cultivadas por 30 dias na concentração combinada de nitrogênio de 0n05 mM (NH_4NO_3 e KNO_3) (resultados analisados usando o teste t Student)

Nível												Menor Média Quadrada
TT105::FUE_52 Evento 1	A											6,8000000
TT105::FUE_39 Evento 1	A	B										6,5352941
TT105::FUE_52 Evento 2		B	C									5,6272727
TT105::FUE_39 Evento 2		B	C									5,6240000
TT105::FUE_504 Evento 1		B	C									5,5956522
TT105::FUE_39 Evento 3			C	D								5,4400000
TT105::FUE_504 Evento 2			C	D								5,166667
TT105::FUE_52 Evento 3			C	D	E							5,1473684
TT105::FUE_504 Evento 3			C	D	E							4,8882353
TT105::GUS						F	G	H	I			3,6458333

Os resultados semelhantes foram obtidos ao verificar os mesmos eventos em concentração semelhante de nitrogênio de 0,2 mM. Os quatro eventos transformados com TT105::NUE_39 produzido estatisticamente a biomassa maior significativa quando comparado às plantas de controle. Os resultados semelhantes foram obtidos com 3 eventos transformados com TT105::NUE_52 e 2 eventos transformados com TT105::NUE_504 conforme mostrado na Tabela 37.

Tabela 37: Menor média quadrada do peso recente medida de ~25 plantinhas cultivadas por 30 dias na concentração combinação de nitrogênio de 0,2 mM (NH_4NO_3 e KNO_3) (resultados analisados usando o teste t Student)

Nivel												Menor Média Quadrada
TT105::FUE_504 Evento 1	A											7,5250000
TT105::FUE_52 Evento 1	A	B										7,4571429
TT105::FUE_39 Evento 1	A	B										7,2000000
TT105::FUE_39 Evento 2	A	B	C									6,7312500
TT105::FUE_39Event3	A	B	C	D								6,6000000
TT105::FUE_52 Evento 2	A	B	C	D								6,5869565
TT105::FUE 504 Evento 2		B	C	D	E							6,3280000
TT105::FUE 39 Evento 4			C	D	E	F						5,8454545
TT105::GUS (CONTROLE)							G	H	I	J		4,5720000

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

Os resultados positivos também foram obtidos em um ensaio realizado usando sementes T1 das plantas transgênicas expressando em excesso FUE_8, FUE_14 ou FUE__40 sob um promotor ubíquo constitutivo (35S), conforme mostrado na Tabela 38 abaixo.

Tabela 38: Menor média quadrada do peso recente medido a partir de ~25 plantinhas cultivadas por 27 dias em 0,05 e

0,2 mM de concentração combinada de nitrogênio (NH_4NO_3 e KNO_3) (resultados analisados usando o teste t Student MANOVA)

Nivel						Menor Média Quadrada
35S::FUE 14	B					6,614423
35S::FUE 40	B	C				5,552381
35S::FUE 8		C				5,252
35S::GUS Evento 1			D	E	F	4,217095
35S::GUS Evento 2					F	3,27

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

Os resultados semelhantes foram obtidos para diferentes eventos de outras construções expressando os genes FUE. Uma construção adicional com o gene FUE_39 sob o promotor 35S foi verificada usando esse ensaio conforme mostrado na Tabela 39 abaixo. Além disso, dois eventos independentes de transformação expressando em excesso o gene FUE_49 e eventos adicionais transformados com FUE_4, FUE_3, ou FUE_43 mostraram significativamente biomassa mais alta produzida nas condições limitantes de nitrogênio testadas conforme mostrado na tabela 39 abaixo.

Tabela 39: Menor média quadrada do peso recente medido a partir de ~25 plantinhas cultivadas por 27 dias em 0,05 e 0,2 mM de concentração combinada de nitrogênio (NH_4NO_3 e KNO_3) (resultados analisados usando o teste t Student MANOVA)

Nivel																	Menor Média Quadrada
35S::FUE_43 evento 1	A																5,572
35S::FUE_49 evento 1	A	B															5,025
35S::FUE_3 evento 1	A	B															4,924
5134.1	A	B	C														4,7
35S::FUE_49 evento 2	A	B	C	D													4,512
35S::FUE_4 evento 1	A	B	C	D	E												4,383333
tipo selvagem						F	G	H	I	J	K	L					3,123944
35S::GUS								H	I	J	K	L	M	N	O	P	2,702041

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

Considerando os resultados obtidos usando esse ensaio, diversos genes FUE mostraram sua capacidade de induzir uma melhoria significativa na eficiência do uso de nitrogênio. Os genes que mostraram os resultados significados são: FUE_504, FUE_39, FUE_52, FUE_502, bem como o seguinte grupo de genes: FUE_14, FUE_8, FUE_40 e FUE_49, FUE_3, FUE_4 e FUE_43.

Ensaio 2: Ensaio de planta total da eficiência do uso de nitrogênio: Taxa de crescimento na concentração limitada de nitrogênio - Um ensaio adicional projetado para identificar a eficiência melhorada do uso de nitrogênio foi desenvolvido. Esse ensaio segue o crescimento da área de roseta das plantas cultivadas na estufa com disponibilidade limitada de nitrogênio. As sementes esterilizadas de superfície foram plantadas e as plantas cultivadas em 25 °C sob ciclos diários de 23 horas de luz 1 hora de escuro por 7-10 dias no meio 0,5 x Murashige-Skoog na presença de 2 % de sacarose. As mudas de tamanho semelhante foram cuidadosamente transferidas para vasos de 100 ml enchidos com um suporte de meio de crescimento inerte (uma mistura de perlita). As mudas foram permitidas a desenvolver por uma semana adicional irrigadas com uma solução contendo abastecimento abundante de micro e macronutrientes. O excesso de fertilizante foi lavado dos vasos com pelo menos dois volumes de água de torneira de baixo nitrato. Então, as plantas foram individualmente

inspecionadas e somente as plantas saudáveis foram escolhidas para análise da taxa de crescimento. As plantas escolhidas foram aleatoriamente distribuídas em diversas bandejas e usadas para ensaio para análise da taxa de crescimento sob condições limitantes de nitrogênio. As condições limitantes de nitrogênio constantes foram atingidas irrigando as plantas com uma solução contendo 0,5 mM de nitrogênio inorgânico (concentração combinação de KNO_3 e NH_4NO_3), complementada com 2 mM de $CaCl_2$, 1,25 mM de KH_2PO_4, 1,50 mM de $MgSO_4$, 5 mM de KCl, 0,01 mM H_3BO_3 e micro-elementos. Para seguir o crescimento da planta, as bandejas foram fotografadas no dia em que as condições limitantes do nitrogênio foram iniciadas e subseqüentemente a cada 2-3 dias por ~20 dias adicionais. A área de planta da roseta foi então determinada a partir das fotografias digitais usando a metodologia descrita na Figura 6. O software ImageJ foi usado para quantificar o tamanho da planta a partir das fotografias digitais (http://rsb.info.nih.gov/ij/) utilizando scripts proprietários projetados para analisar o tamanho da área de roseta a partir das plantas individuais como uma função do tempo. A porcentagem de crescimento foi calculada como a proporção da área de roseta da planta dividida pela área de planta inicial medida no dia 1. Para identificar as plantas transgênicas dentro do experimento, a presença do gene marcador de seleção foi verificada usando PCR. As amostras de folha foram obtidas das plantas, o DNA genômico foi extraído e servido como modelo para um PCR usando iniciadores específicos para o gene marcador de

148

seleção. As plantas positivas foram rotuladas com a finalidade de excluir da análise as plantas não transgênicas.

Tabela 40: Iniciadores usados para a análise de PCR:

Nome do Iniciador	Seqüência do Iniciador /SEQ ID Nº:
NPTII-F	CGAGAAAGTATCCATCATGGC/SEQ ID Nº:1512
NPTII-R	ATGTCCTGATAGCGGTCCGC/SEQ ID Nº:1513

Resultados

Em concordância com os resultados obtidos no ensaio anterior em que o FUE_39 mostrou NUE melhorado, os resultados aqui apresentados mostram que o FUE_39 significativamente melhorou NUE em todas as plantas. Conforme mostrado na Tabela 41 abaixo, dois eventos independentes transgênicos expressando FUE_39 foram encontrados para exibir NUE otimizado quando comparado às plantas do tipo selvagem ou plantas transgênicas expressando o gene repórter GUS sob o mesmo promotor usado para expressar o transgene FUE_39.

Tabela 41: FUE_39 mostra os resultados de um ensaio de taxa de crescimento sob condições limitantes de nitrogênio. Dois eventos mostrando NUE otimizado foram mostrados.

Nível					Menor Média Quadrada
35S::FUE_39 Evento 1	A				867,53380
35S::FUE_39 Evento 2		B			685,52595
Tipo selvagem			C	D	590,28343

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

Além de FUE_39, da mesma forma, os eventos expressando em excesso FUE_7 e FUE_41 foram encontrados para exibir a taxa otimizada de crescimento sob

condições limitantes do nitrogênio. Conforme mostrado na Tabela 42, a expressão de FUE_7, FUE_41, FUE_50, FUE_16 de acordo com o promotor 35S é significativamente melhor do que as plantas de controle (tipo selvagem ou expressando um gene repórter de acordo com promotor 35S).

Tabela 42

Nível														Menor Média Quadrada
5351.3 (35S::FUE_7)	A													1184,9559
5375.1 (35S::FUE_41)	A													1010,5752
5345.1 (35S::FUE_50)	A	B												956,9474
5361.2 (35S::FUE_16)		B	C											824,0414
4545.7 (35S::GUS)				D	E	F	G	H	I					515,8663

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

Dessa forma, o ensaio aqui descrito segue a capacidade da planta de crescer em condições limitantes do nitrogênio. Considerando que as plantas transgênicas acima descritas desenvolveram-se significativamente mais rápidas do que as plantas de controle, pode ser presumido que os eventos pendentes foram capazes de assimilar a disponibilidade do nitrogênio e convertê-lo à matéria orgânica. Como todas as plantas no experimento foram tratadas de forma semelhante, os resultados indicam que os eventos pendentes foram capazes de utilizar de forma mais eficiente o nitrogênio disponível e, portanto, exibir a eficiência otimizada do uso de nitrogênio.

Ensaio 3: Ensaio de Produção da

150

Semente em disponibilidade limitada de nitrogênio - As plantas de milho absorvem e armazenam a maioria do nitrogênio nas folhas e talo até a floração. Os nutrientes armazenados são então redistribuídos às sementes de desenvolvimento. No presente ensaio, as plantas foram cultivadas em condições limitadas do nitrogênio conforme detalhado no Ensaio 2 acima por cerca de 45 dias e então cultivadas até a maturidade total somente com água de torneira. Portanto, as plantas são forçadas a redistribuir o nitrogênio armazenado às sementes de desenvolvimento. As plantas que armazenam mais nitrogênio são esperadas para ter uma melhor produção. As sementes foram coletadas das plantas individuais e a produção foi medida como o peso da semente. A produção de pelo menos cerca de 6 plantas transgênicas foi normalmente medida para cada evento testado.

Resultados

Nesse ensaio, as plantas transgênicas expressando em excesso o FUE_43 (sob o promotor 35S) foram encontradas como tendo aumentado o rendimento da semente conforme mostrado na Tabela 43. Os resultados de um dos eventos são abaixo apresentados.

Tabela 43

Nível											Menor Média Quadrada
5151.2(35s::NUE43)	A										0,10411111
4542.4 (35S::GUS)		B	C	D	E	F	G	H			0,06647500

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

Considerados em conjunto, os resultados mostrados aqui demonstram que os genes desta invenção são capazes de melhorar os diferentes aspectos da

eficiência do uso de nitrogênio conforme demonstrado pelos resultados dos diferentes ensaios aqui revelados.

EXEMPLO 7

Avaliação do crescimento da planta transgênica sob condições de estresse abiótico

A tolerância à salinidade ou estresse osmótico tem o objeto de identificar os genes que confere melhor germinação, vigor da muda ou crescimento em alto sal, seca ou combinação dos mesmos ou outros estresses ambientais. As plantas diferem em sua tolerância ao estresse de sal, alto osmótico e seca durante diferentes etapas de desenvolvimento. Portanto, a germinação de semente, desenvolvimento da planta e rendimento foram avaliados independentemente sob as diferentes condições de estresse.

Um típico teste de tolerância de salinidade é produzido obtendo as plantas em diferentes etapas de desenvolvimento e irrigando-as com concentrações crescentes de NaCl (por exemplo, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM) ou concentração constante de NaCl. As plantas transgênicas são então comparadas às plantas de controle em sua aparência fenotípica externa, grau de desvigor e sucesso geral para atingir a maturidade e progênie de rendimento nas concentrações inibitórias para as plantas de controle. Os parâmetros quantitativos da tolerância medida incluem, o peso médio seco e úmido, e o peso das sementes produzidas, o tamanho médio da semente e o número de sementes produzidas por planta. Os ensaios de estresse osmótico (incluindo ensaios de NaCl e manitol) são conduzidos para determinar se

152

um fenótipo tolerante ao estresse osmótico é específico de NaCl ou se em um fenótipo geral relacionado ao estresse osmótico. Os ensaios de seca são realizados, por exemplo, irrigação de parada durante longo período e medição da taxa de desvigor, recuperação e produção final. As plantas tolerantes ao estresse osmótico são de modo geral mais tolerantes às condições de seca, salinidade e congelamento e, portanto, são altamente valiosas em termos de traços agronômicos.

Materiais e Métodos

O método usado para testar as plantas para tolerância aumentada ao estresse abiótico inclui o teste de germinação e crescimento da muda sob condições adversas, tais como, alta salinidade e alto osmótico.

Ensaio de germinação sob estresses abióticos - Os testes de germinação comparam a porcentagem das sementes das plantas transgênicas que poderiam concluir o processo de germinação (protrusão de radícula do revestimento da semente e abertura completa de cotiledôneos) para a porcentagem das sementes das plantas de controle tratadas da mesma forma.

A avaliação da germinação e vigor da muda foi conduzida por três semanas após a plantação. Para medir a germinação e crescimento da muda, as sementes das plantas T2 foram esterilizadas na superfície e individualmente plantadas em placas quadradas de ágar contendo, por exemplo, meio basal solidificado (50 % de meio

153

Murashige-Skoog (MS) + vitaminas complementadas com 0,8 % de ágar da planta) complementadas com alta salinidade (150 mM de NaCl) ou alto osmótico (210 mM de manitol). Após a plantação, as placas foram transferidas por 2-3 dias em 4 °C para estratificação e então crescimento por três semanas.

Para seguir a germinação e crescimento em condições adversas, as plantas foram passadas por triagem manual ou automaticamente e o tamanho da planta foi determinado. Diversos eventos independentes de transformação selecionados do Exemplo 5 foram analisados de cada construção. As plantas expressando os genes desta invenção foram comparadas às plantas de controle (tipo selvagem ou plantas de imitação transformadas) plantadas nas mesmas placas sob as mesmas condições.

Crescimento da muda sob estresse abiótico - Um experimento complementar realizado com as mudas após a tolerância das plantas às condições adversas. As sementes esterilizadas de superfície foram plantadas no meio basal [50 % do meio Murashige-Skoog (MS) + vitaminas complementadas com 0,8% de ágar da planta como agente de solidificação] na presença de Kanamicina (para plantas transgênicas) ou em sua ausência (para plantas de controle do tipo selvagem). Após a plantação, as placas foram transferidas por 2-3 dias em 4 °C para estratificação e então crescimento em 25 °C sob ciclos diários de 23 horas de luz e 1 hora de escuro por 7 a 10 dias. Nesse ponto de tempo, as mudas aleatoriamente escolhidas foram cuidadosamente transferidas às placas contendo condições de

alta salinidade (150 mM de NaCl) ou condições parecidas com a alta osmolaridade encontrada durante a seca (210 mM de manitol). O crescimento da planta foi seguido como uma função do tempo utilização formação de imagem digital. Para seguir o crescimento da planta em condições adversas, as plantas foram fotografadas no dia em que foram transferidas às condições de estresse (Dia 1). As fotografias foram subseqüentemente tiradas em dias alternados após a transferência das plantas à condição de estresse e até 12 dias após a transferência. A área de planta da roseta foi então determinada a partir das fotografias digitais. O software ImageJ foi usado para quantificar o tamanho da planta a partir das fotografias digitais (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Os scripts proprietários foram projetados para analisar o tamanho das áreas de roseta das plantas individuais como uma função do tempo. A Figura 6 mostra a metodologia usada para quantificação da área de imagem. Cinco a dez eventos independentes de transformação foram analisados de cada construção e pelo menos 6 plantas aleatoriamente selecionadas de cada evento foram analisadas em cada experimento de estresse. As plantas expressando os genes desta invenção foram comparadas às plantas de controle plantadas nas mesmas placas induzindo o estresse (controles interno) ou na medição média de todas as plantas de controle usadas no mesmo experimento (todos os 5 controles).

Resultados

A tolerância de salinidade e osmótica foi ensaiada pelo seguinte crescimento da planta

durante o estresse, conforme evidenciado pela área verde da planta. Os diversos genes e construções foram verificados usando o procedimento acima descrito e os resultados significativos de tolerância foram averiguados. Por exemplo, as plantas transgênicas expressando em excesso os seguintes genes demonstraram estatisticamente tolerância melhorada significativa ao estresse de alta salinidade: FUE_7, FUE_10, FUE_14, FUE_16, FUE_33, FUE_37, FUE_39, FUE_40, FUE_41, FUE_47, FUE_50, FUE_502, FUE_503 e FUE_504.

Além disso, os seguintes genes fornecem resultados estatisticamente significativos no acúmulo da tolerância ao estresse abiótico das plantas transgênicas expressando em excesso a mesma quando expostas ao estresse de alta osmolaridade: FUE_3, FUE_9, FUE_10, FUE_13, FUE_37, FUE_39, FUE_40, FUE_41, FUE_43, FUE_49, FUE_502, FUE_503 e FUE_504.

Além disso, as plantas transgênicas expressando FUE_43 e FUE_503 foram averiguadas como tendo capacidade aumentada de germinar sob as condições altas osmóticas (Dados não demonstrados).

Além do mais, as plantas transgênicas expressando os seguintes genes mostraram significativamente tolerância aumentada ao estresse abiótico à salinidade ou alta osmolaridade: FUE_10, FUE_37, FUE_39, FUE_40, FUE_41, FUE_502 e FUE_504.

Deve ser observado que a significância dos resultados é de modo geral apoiada pelos diversos eventos transgênicos expressando os genes acima e,

em alguns casos, sob diferentes promotores. A Tabela 44a-b resume esses achados. Os resultados são expressos como a porcentagem da área de crescimento relacionada ao tamanho da planta quando transferida às condições de estresse (i.e., Dia 1).

Tabela 44a - lista de genes mostrando crescimento melhorado da muda sob estresse de salinidade

Gene	Promotor	Ensaio de Crescimento da muda de Salinidade

FUE_502 — 35S

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5125,3	A		402,61787
CONTROLE		B	270,40066

FUE_503

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5184,3	A		314,80237
CONTROLE		B	163,06265

FUE_504 — 35S

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5147,5	A		335,25831
CONTROLE		B	258,27089

TT105

Nível			Menor Média Quadrada
5432,9	A		525,38863
5433,5	A		382,86771
5433,4	A		346,97902
5433,6	A		342,96170
CONTROLE		B	257,88942

FUE_7 — 35S

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5351,8	A		508,52644
CONTROLE		B	410,02970

FUE_10 — 35S

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5331,1	A		404,86015
CONTROLE		B	320,63800

FUE_14 — RootP

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE14	A		239,97813
35S::GUS		B	193,74654

35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5451,3	A			170,50102
5454,1	A			154,77155
5454,4	A	B		151,54574
CONTROLE			C	130,92706

Continuação da tabela 44a

FUE_16 RootP

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE16	A		184,69992
35S::GUS		B	146,24402

FUE_33 35S

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE33	A		237,73455
35S::GUS		B	202,99142

FUE_37 RootP

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE37	A		228,14620
35S::GUS		B	195,15386

FUE_39 35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5131,1	A			272,46189
CONTROLE		B	C	195,66170

FUE_40 35S

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE_40	A		261,52868
35S::GUS		B	160,55573

FUE_41 35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5373,1	A			452,27789
CONTROLE		B	C	373,83060

FUE_47 35S

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
FUE47	A		202,37548
35S::GUS		B	142,22673

FUE_50

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5343,1	A		452,75078
CONTROLE		B	376,63355

Tabela 44b - lista de genes mostrando crescimento melhorado da muda sob estresse osmótico

Gene Promotor

Ensaio de Crescimento da muda Osmótico

FUE_502 35S

Evento/Gene					Menor Média Quadrada
5125,9	A				
5125,10		B			156,16627
5125,1		B			145,40683
CONTROLE			C		92,51323

158

Continuação da tabela 44b

TT105

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
TT105::FUE502	A		145,94616
TT105:GUS		B	129,39693

FUE_503

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5182,3	A		163,93440
5181,2	A		151,83208
CONTROLE		B	126,70438

FUE_504 TT105

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
TT105::FUE504	A		172,68759
TT105:GUS		B	145,85106

FUE_3 35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5213,1	A			309,25610
CONTROLE		B	C	244,05079

FUE_9 RootP

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE9	A		213,03081
35S::GUS		B	175,62303

FUE_10 35S

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5331,1	A		438,55622
CONTROLE		B	202,58577

FUE_13 35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5235.2,7	A			312,47256
CONTROLE, 7		B	C	233,04378

RootP

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE13	A		173,97881
35S::GUS		B	134,41030

FUE_37 RootP

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE37	A		205,43584
35S::GUS		B	168,99783

FUE_39 35S

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
5131,1	A		261,25201
CONTROLE		B	177,03349

FUE_40 35S

Experimento realizado em plantas T1

Evento/Gene			Menor Média Quadrada
RootP::FUE_40	A		142,16470
35S::GUS		B	125,81481

159

Continuação da tabela 44b

FUE_41 35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5373,2	A			306,74015
5371,4		B		231,50773
CONTROLE			C	196,22318

FUE_49 35S

Evento/Gene				Menor Média Quadrada
5243.3,7 dias	A			382,37255
CONTROLE, 7 dias		B	C	270,81987

EXEMPLO 8

Avaliações de alterações na arquitetura de raiz nas plantas transgênicas

Muitos traços chave na agricultura moderna podem ser explicados por alterações na arquitetura de raiz. O tamanho e profundidade da raiz correlacionam-se à tolerância de seca e eficiência do uso de fertilizante. Os sistemas de raiz mais profunda podem acessar a água em camadas mais profundas do solo. De forma semelhante, um sistema de raiz altamente ramificada fornece melhor cobertura do solo, portanto, pode efetivamente absorver todos os macro e micronutrientes disponíveis resultantes na eficiência otimizada do uso de fertilizante. Para testar se as plantas transgênicas produzem uma diferente estrutura de raiz, as plantas foram cultivadas em placas de ágar colocadas verticalmente. As placas foram fotografadas em dias alternados e o comprimento máximo e área total coberta pelas raízes da planta foram avaliados a partir das fotografias digitais. A partir de cada construção criada, diversos eventos independentes de transformação foram verificados em duplicatas. Para avaliar as diferenças significativas entre as características da raiz, um ANOVA usando o teste t Students foi utilizado com a finalidade de

160

identificar os eventos mostrando as características pendentes de raiz e fornecer um escore estatístico dos achados (ensaios estatísticos estão descritos acima).

Resultados

Ao analisar os diferentes aspectos da arquitetura de raiz, tal como área total da raiz coberta e profundidade máxima (comprimento) atingidos pelo sistema de raiz, foi averiguado que as plantas transgênicas expressando os genes FUE possuem características notáveis. Por exemplo, as plantas transgênicas expressando em excesso FUE_10 e FUE_49 foram averiguadas como tendo uma maior cobertura de área de raiz com base nas medições realizadas 21 dias após a germinação (vide Tabela 45).

Tabela 45: Área de Raiz (em cm^2) medida no dia 21

Nível				Menor Média Quadrada
21 dias 35S::NUE10	A			1,3313852
21dias 35S::NUE49	A			1,3253389
21 dias 35S::GUS		B	C	1,1289837

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

De forma semelhante, as plantas expressando em excesso FUE_16 e FUE_7 original foram averiguadas para produzir a arquitetura de raiz mais longa (vide Tabela 46 abaixo). FUE_16 foi averiguado para produzir o sistema de raiz penetrante mais rápido de todas as construções testadas em todos os dias testados (7, 14 e 21 dias após a germinação).

Na prática, esses achados sugerem que as plantas expressando em excesso FUE_16 e FUE_7_Original atingem camadas de solo mais profundas

comparadas às outras plantas no mesmo período de tempo. Essas plantas são esperadas para recuperar de forma máxima os fertilizantes e água do solo e suportar melhor os períodos mais longos de seca.

Tabela 46: Análise estatística do comprimento da raiz (em cm) medida no dia 21

Nível					Menor Média Quadrada
21 dias 35S::FUE_7_Original	A				6,5156396
21 dias 35S::FUE_16	A	B			6,1808293
21 dias 35S:: GUS			C	D	5,5097884

Os níveis não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes

A arquitetura otimizada de raiz permite que as plantas transgênicas expressando os genes FUE absorvam de forma bem-sucedida os nutrientes (fertilizantes) e água disponíveis no solo. A captação e recuperação de nutriente aumentadas em uma característica chave para eficiência melhorada do uso de fertilizante e tolerância ao estresse abiótico. Os sistemas de raiz mais profundos permitem que as plantas acessem a água disponível nas camadas mais profundas do solo, otimizando a tolerância para prolongar os períodos de seca e, portanto, garantir altos rendimentos também sob condições rígidas.

EXEMPLO 9

Plantas expressando FUE40 são caracterizadas por uma arquitetura de planta para produção máxima de semente.

A presença de múltiplos órgãos produzindo semente (vagens, frutos, etc.) e fortes talos de floração é a característica chave para produzir altos

rendimentos de semente. Ao reduzir a presente invenção à prática, os presentes inventores averiguaram de forma surpreendente que as plantas transgênicas expressando FUE_40 sob um promotor constitutivo melhoraram a arquitetura do órgão reprodutivo. Os talos de floração eram raramente rígidos e fortes e transporte um grande número de síliquas (vide Figura 9 mostrando os diferentes eventos independentes de transformação). Os resultados foram confirmados por um ensaio triplo cego identificando as plantas com mais síliquas por planta, provavelmente devido ao crescimento mais rápido dos brotos laterais de inflorescência. De forma interessante, todas as plantas eram diferentes eventos de transformação com a mesma construção, gene NUE40 sob o promotor 35S (vide Fig. 9). Essa alteração nas características de desenvolvimento da planta pode ser usada para significativamente aumentar o rendimento de semente de uma planta.

EXEMPLO 10

CT-9 (SEQ ID N°: 1340,1341) e CT-71 (SEQ ID N°: 1342,1343) conferem tolerância à seca e rendimento aumentado do tomate transgênico

Ao ainda reduzir a presente invenção à prática, os presentes inventores revelaram de forma surpreendendo que CT_9 (SEQ ID N°. 1340, 1341 previamente revelada no Pedido PCT N° WO2005/121364) e CT_71 (SEQ ID N°. 1342 e 1343, previamente revelada no Pedido PCT N° WO2005/121364) confere resistência à seca e rendimentos aumentados nas plantas transgênicas expressando o mesmo.

CT_9 e CT_71 foram revelados no Pedido PCT N° WO2005/121364 para Evogene Ltd. e na US5.597.718 (CT_71).

Materiais e Procedimentos Experimentais

Ensaio de seca - O ensaio de seca aqui descrito foi efetuado nas condições em campo imitando o estresse de seca ao controlar a quantidade de água abastecida e os intervalos de seca. O ensaio, sistema de irrigação por gotejamento de uma fonte (OSDI), é semelhante ao campo do fazendeiro, considerando que cria deficiência de água de uma forma relativamente uniforme e permite a medição do efeito da seca em populações de pequeno tamanho de plantas.

Assim, o presente método de irrigação pode ser efetuado conforme segue:

(a) colocação em um solo de um sistema de irrigação por gotejamento de modo a obter os orifícios de irrigação distribuídos 20-40 cm (p.ex., 30 cm) entre si nas direções X e Y; e

(b) irrigação contínua através de cada um dos referidos orifícios de irrigação em uma taxa de irrigação de 0,5-2 litros de água por hora.

Uma configuração de um sistema de irrigação (10) para imitar as condições de seca que compreende os seguintes componentes e ilustrado na Figura 10 pode ser usada em conformidade com os ensinamentos da presente invenção:

(i) um sistema de irrigação por gotejamento com uma pluralidade de orifícios de irrigação 12 distribuídos 20-40

cm entre si nas direções X e Y; e

(ii) um sistema de controle e abastecimento de água 14 para continuamente irrigar cada um dos referidos orifícios de irrigação 0,5-2 litros de água por hora. Os gotejadores preferidos usados são a linha de gotejador de parede espessa compensador por pressão com sistemas de anti-sifão e anti-dreno (UniRam™ CNL #16010, Taxa de Fluxo 1,6 l/h da Netafim Israel). O sistema anti-sifão impede o fluxo de retorno de sujeira na linha do gotejador enquanto o sistema de anti-dreno (CNL) elimina o efeito de drenagem e reenchimento, e melhora a eficiência na irrigação por pulso.

O método de OSDI foi desenvolvido com base nos sistemas de irrigação de aspersores de fonte de linha (Hanks et al. 1976 Soil Sci. Soc Am. J. 40 p. 426-429) com modificações significativas. Ao invés de irrigação por aspersor, a irrigação por gotejamento foi usada. Com a finalidade de criar uma camada úmida uniforme e profunda (pelo menos profundidade de 60cm) e não a camada com formato de cebola que é tipicamente criada pela irrigação por gotejamento, um sistema de irrigação por gotejamento de compensação de baixa pressão foi usado que permite o fornecimento de pequena quantidade em um período de tempo relativamente longo.

O experimento foi criado à luz do solo durante o verão de 2006 (de julho a setembro), em um armazém em campo aberto próximo a Rehovot, Israel.

A capacidade de água do solo foi medida usando os procedimentos padrão ao amostrar o solo

das seguintes três profundidades: 0 a 20 cm, 20 a 40 cm e 40 a 60 cm. O teor de água nessas camadas de solo foi medida rotineiramente a cada semana. O solo continha 5 % de água higroscópica, enquanto a capacidade máxima de água do solo era de 20 %. Todos os fertilizantes foram aplicados no solo antes da plantação. A quantidade de fósforo e potássio foi calculada como suficiente para toda a temporada. O nitrogênio foi aplicado conforme recomendado, igualmente a todos os tratamentos através do sistema de irrigação.

Cada fileira, com largura de 193 cm, continha as linhas de irrigação por gotejamento criando a cobertura de nove gotejadores por 1 metro quadrado. O controle de água foi feito separadamente para cada tratamento. O solo foi seco completamente antes do início do experimento.

A plantação foi feita em uma condição de sementeira sob irrigação regular de água. As mudas foram transplantadas após quatro semanas no solo úmido. A quantidade de água que foi usada para uniformemente irrigar antes do transplante atingiu a capacidade máxima de água (20 % w/w) na profundidade de 60 cm, entretanto sem criação de sobrecarga de água. Cada planta foi transplantada próxima a um gotejador, 30 cm de distância entre as plantas com uma densidade total de 2600 plantas por 1000 metros quadrados, de acordo com o protocolo comercial de crescimento. O experimento foi estruturado em quatro blocos contendo três fileiras irrigadas com diferentes níveis de água e intervalos (WLI-0, WLI-1, WLI-2). Os diferentes

regimes de água tiveram início somente quatro semanas após a transplantação, quando as plantas atingiram a etapa de floração. A quantidade de água abastecida a cada semana durante o ensaio foi calculada em cada início da semana após as recomendações dos protocolos padrão de crescimento.

O tratamento WLI-0 recebeu o volume de irrigação semanal total recomendado, porém dividido em três irrigações. Os dois outros tratamentos (WLI-1 e WLI-2) representam dois diferentes níveis de deficiência de água. O WLI-1 também foi irrigado três vezes por semana, porém a quantidade de água fornecida foi metade da irrigação fornecida ao WLI-0. No final de cada semana, as plantas WLI-1 receberam a quantidade de água exigida para atingir a capacidade máxima de água do solo. O WLI-2 não foi irrigado durante a semana, porém, ao invés disso, no início de cada semana. A água foi fornecida para atingir a capacidade máxima de água. O experimento de estresse de água durou todo o período de floração (23 dias) correspondente a 4 ciclos dos estresses acima descritos. Após isso, todos os tratamentos receberam a quantidade recomendada de água.

O cálculo da quantidade de água era igual à diferença entre o teor de água no solo seco com capacidade máxima de água. No final de cada ciclo de estresse, a quantidade de água foi comparada entre os tratamentos de acordo com o teor efetivo de água no solo (Tabela 47).

Tabela 47 Teor de água (%) no solo no final do 4° ciclo de estresse (23 dias)

	Teor de água no solo (% w/w)		
Tratamento / Profundidade do Solo (cm)	Controle - WLI-O	WLI-1	WLI-2
0-20	17	14	10
20 - 40	16	12	12
40-60	15	12	11

De nota, durante os tratamentos do período de estresse WLI-1 e WLI-2 recebidos no total de 75 % menos água comparado ao controle (WLI-0).

Clonagem de gene e expressão - A identificação bioinformática, clonagem e avaliação fenotípica de CT-9 e CT-71 foram descritos na Patente N°: WO2005/121364.

CT-9 ou CT-71 ligados às construções binárias, compreendendo o promotor 35S foram transformados em plantas de tomate via transformação de Agrobacterium tumefacience.

60 µL das células competentes de Agrobacterium tumefaciens LB4404 (cerca de 10^9 células/mL) foram transformadas com 20 ng de plasmídio binário via eletroporação, usando um eletroporador MicroPulser (Biorad), 0,2 cm de cadinhos (Biorad) e programa de eletroporação EC-2 (Biorad).

As células de Agrobacterium foram cultivadas em 0,8 mL de meio líquido de LB em 28 °C por 3 h e 0,2 mL da suspensão de célula foi preparada em placas de ágar LB complementadas com a estreptomicina de antibiótico de 300 mg/L (para cepa de Agrobacterium LB4404) e kanamicina 50 mg/L (Sigma). As placas foram então incubadas em 28 °C por 48 h.

As colônias de Agrobacterium

foram cultivadas e a amplificação por PCR foi realizada nas células de Agrobacterium, usando os iniciadores que foram projetados para estender a seqüência inserida no vetor binário.

Os produtos de PCR foram separados em 1,5 % de géis de agarose e os tamanhos de produto foram determinados ao comparar o meio de DNA (MBI Fermentas). Os produtos de PCR com o tamanho previsto foram seqüenciados usando os iniciadores que foram usados para a amplificação de PCR. O seqüenciamento da seqüência inserida foi realizado para verificar que os clones corretos foram introduzidos nas células de Agrobacterium.

O seqüenciamento de DNA foi efetuado usando o seqüenciador de ABI 377 (Amersham Biosciences Inc.).

Transformação das plantas de tomate Micro-Tom com CT_9 ou CT-71 - A transformação de tomate (Lycopersicon esculentum, var MicroTom) e cultivação das plantas transgênicas foi efetuada de acordo com Curtis et al. 1995 Methods Mol Biol. 1995;44:59-70., e Meissner et. al. 2000. Plant J. 2000 May;22(3):265-74. Após a transformação, as plantas de tomate T1 MicroTom foram cultivadas em uma mistura contida em vasos de 1000 ml, até a colheita do conjunto de fruto e sementes T2. As plantas transgênicas de tomate micro-torn tomate expressando em excesso os genes CT-9 ou CT-71 sob a regulação do promotor 35S foram polinizadas de forma cruzada com as plantas de variedade comercial M82. Obtendo aleatoriamente quatro

plantas originadas de quatro diferentes eventos de inserção representando o efeito de posição. Os híbridos de F1 que incluem o transgene foram usados para avaliação adicional. Como um controle negativo, as plantas não transgênicas que se segregaram das mesmas populações transgênicas foram usadas. Para distinguir entre as plantas transgênicas e não transgênicas, uma triagem de PCR foi efetuada usando os iniciadores do gene NPTII conforme descrito no exemplo 6.

Resultados

Na etapa de amadurecimento do fruto de cerca de 90 % das frutas vermelhas, as plantas foram avaliadas e os frutos foram colhidos. O desempenho da planta foi avaliado ao medir a massa das coberturas, comprimento de raiz e massa. A produção foi medida ao obter os frutos de tamanho total vermelhos e verdes para cada planta. Os resultados foram analisados usando o teste de um lado Anova e resumidos na Tabela 48, abaixo.

Tabela 48: Rendimento total de fruto das linhas de planta cultivadas sob estresse de água severo (WLI-2) expressando o gene CT-9 comparado às plantas de controle.

Nome da linha	Média do peso de fruto de tamanho completo total por planta (g) - construção de gene	Média do peso de fruto completo total por planta (g) — melhor evento de desempenho
Controle - plantas não transgênicas	656 c	656 c
CT-71	692 bc	707 bc
CT-9	782 a	840 a

a, b, c - Níveis não conectados pela mesma letra são estatisticamente diferentes significativamente em P<0,05

As linhas transgênicas expressando em excesso CT-9 mostraram significativamente maior rendimento do fruto sob condições severas de deficiência de água (WLI-2) comparadas às plantas de controle.

A melhoria no rendimento foi observada também sob irrigação regular de água para as linhas expressando CT-9 e CT-71 (vide Tabela 49, abaixo).

Tabela 49: Rendimento total de fruto das linhas de planta expressando em excesso CT-9 comparado às plantas de controle cultivadas sob irrigação favorável de água (WLI-0)

Nome da linha	Média do peso de fruto de tamanho completo total por planta (g) – construção de gene	Média do peso de fruto completo total por planta (g) — melhor evento de desempenho
Controle negativo - plantas não transgênicas	820 b	820 b
CT-71	1010 a	1046 a
CT-9	993 a	997 ab

a, b, c - Níveis não conectados pela mesma letra são estatisticamente diferentes significativamente em P<0,05

EXEMPLO 11

Plants expressando em excesso FUE_34_Evo são caracterizadas pela ramificação otimizada lateral

O controle da ativação lateral de botões pode ter um importante papel na agricultura moderna e criação de flores e ornamentos. No caso da criação moderna do milho, os criadores trabalharam por muitos anos com relação à redução de brotos (ramos lateral) com a finalidade de criar plantas de única casca que atingem a maturação simultaneamente. Por outro lado, o controle de afilhamento na criação do arroz também possui importância,

pois cascas múltiplas permitirão a produção de diversas panículas na mesma planta, enquanto o afilhamento em excesso possui efeitos deletérios sobre a planta. De forma semelhante, a ramificação lateral é importante para ornamentos, por exemplo, para produzir múltiplas flores a partir do mesmo talo, ou para produzir flores grandes únicas a partir de cada talo.

Conforme mostrado na Figura 8, as plantas que expressam FUE_34_Evo exógeno são caracterizadas por ramificação múltipla do broto. A expressão de FUE_34 Evo (SED ID N°: 54) sob um promotor ubíquo constitutivo provocava fenótipo de ramificação lateral ativo raramente. Todos os eventos transgênicos obtidos com essas construções exibem esse fenótipo específico de ramificação em cada nó. Esse fenótipo pode ser resultado de perda da dominância apical da planta ou mais provável à expressão contínua de Evo_34_Evo de acordo com o promotor constitutivo ubíquo. Evo_34 é um fator de transcrição de caixa MADS que contém, além disso, os locais de fosforilação putativos para quinase de proteína dependente de cAMP-e cGMP, quinase de caseína II e quinase de Proteína C. A expressão de acordo com um promotor preferido de raiz, tal como, RootP provocada pela criação de um fenótipo de raiz altamente ramificado compacto. FUE_34_Evo pode ser, portanto, usado, por exemplo, para projetar plantas com ramificação controlada, adicionando um promotor induzível ou constitutivo ativo em determinadas partes anatômicas da planta e/ou determinadas etapas de

desenvolvimento. De forma semelhante, o gene pode ser silenciado e, dessa forma, o afilhamento ou ramificação lateral terão a alta probabilidade de ser evitado. Outro uso potencial para esse gene é para MAS (Criação assistida de marcador).

EXEMPLO 12

Seqüências ortólogas e homólogas

A Tabela 50 lista um resumo das seqüências ortólogas e homólogas das seqüências de polinucleotídio e seqüências de polipeptídio da invenção identificada usando BLAST (programa TBLASTX) com pelo menos 85% de semelhança em pelo menos 85% de todo o comprimento da proteína.

Tabela 50

Gene	SEQ ID N°: Polinucleotídio/polipeptídio	organismo	Espécie	cobertura	identidade de porcentagem
FUE 1	**219/768**	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 1	**220/769**	arroz	*Oryza sativa*	89,47	77,44
FUE 1	**221/770**	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,22	81,95
FUE 1	**222/771**	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	88,72	84,96
FUE 1	**223/772**	trigo	*Triticum spp.*	96,99	96,24
FUE 1	224/773	trigo	*Triticum spp.*	100	98,5
FUE 2	225/774	milho	*Zea mays*	98,48	95,45
FUE 2	226/775	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 2	227/776	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 2	228/777	sorgo	*Sorgo bicolor*	89,39	84,85
FUE 2	229/778	sorgo	*Sorgo bicolor*	89,39	84,85
FUE 2	230/779	sorgo	*Sorgo bicolor*	89,39	84,85
FUE 2	231/780	trigo	*Triticum spp.*	100	100
FUE 3	232/781	milho	*Zea mays*	92,08	88,12
FUE 3	233/782	milho	*Zea mays*	100	99,01
FUE 3	234/783	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 3	235/784	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 3	236/785	sorgo	*Sorgo bicolor*	88,12	85,15
FUE 3	237/786	sorgo	*Sorgo bicolor*	88,12	85,15
FUE 3	238/787	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	96,04	91,09

123

Continuação da tabela 50					
FUE 3	239/788	trigo	*Triticum spp.*	100	99,01
FUE 4	240/789	milho	*Zea mays*	97,63	96,45
FUE 5	241/790	cevada	*Hordeum vulgare*	89,68	76,98
FUE 5	242/791	cevada	*Hordeum vulgare*	89,68	76,98
FUE 5	243/792	algodão	*Gossypium ssp.*	85,71	72,22
FUE 5	244/793	algodão	*Gossypium ssp.*	85,71	72,22
FUE 5	245/794	milho	*Zea mays*	91,27	77,78
FUE 5	246/795	milho .	*Zea mays*	88,89	80,16
FUE 5	247/796	milho	*Zea mays*	88,89	80,16
FUE 5	248/797	milho	*Zea mays*	98,41	95,24
FUE 5	249/798	milho	*Zea mays*	99,21	99,21
FUE 5	250/799	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 5	251/800	arroz	*Oryza sativa*	86,51	80,16
FUE 5	252/801	arroz	*Oryza sativa*	86,51	80,16
FUE 5	253/802	arroz	*Oryza sativa*	91,27	83,33
FUE 5	254/803	arroz	*Oryza sativa*	92,06	83,33
FUE 5	255/804	sesame	*Sesamum indicum*	85,71	73,81
FUE 5	256/805	sesame	*Sesamum indicum*	85,71	74,6
FUE 5	257/806	sorgo	*Sorgo bicolor*	88,1	78,57
FUE 5	258/807	sorgo	*Sorgo bicolor*	97,62	92,06
FUE 5	259/808	sorgo	*Sorgo bicolor*	97,62	92,06
FUE 5	260/809	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	88,89	80,95
FUE 5	261/810	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	97,62	93,65
FUE 5	262/811	tabaco	*Nicotiana spp.*	85,71	70,63
FUE 5	263/812	tabaco	*Nicotiana spp.*	85,71	70,63
FUE 5	264/813	tabaco	*Nicotiana spp.*	85,71	70,63
FUE 5	265/814	trigo	*Triticum spp.*	90,48	76,98
FUE 5	266/815	trigo	*Triticum spp.*	91,27	76,98
FUE 5	267/816	trigo	*Triticum spp.*	90,48	76,98
FUE 5	268/817	trigo	*Triticum spp.*	91,27	77,78
FUE 5	269/818	trigo	*Triticum spp.*	85,71	79,37
FUE 40	270/819	cevada	*Hordeum vulgare*	85,89	77,91
FUE 40	271/820	milho	*Zea mays*	85,89	80,37
FUE 40	272/821	milho	*Zea mays*	85,89	80,37
FUE 40	273/822	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 40	274/823	arroz	*Oryza sativa*	85,89	71,17
FUE 40	275/824	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,5	73,01
FUE 40	276/825	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,5	73,01
FUE 40	277/826	sorgo	*Sorgo bicolor*	90,8	86,5
FUE 40	278/827	sorgo	*Sorgo bicolor*	91,41	87,73
FUE 40	279/828	sorgo	*Sorgo bicolor*	91,41	87,73
FUE 7	280/829	milho	*Zea mays*	98,63	98,63
FUE 7	281/830	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,67	86,3
FUE 9	282/831	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 9	283/832	sorgo	*Sorgo bicolor*	94,35	90,4
FUE 10	284/833	milho	*Zea mays*	99,14	99,14

Continuação da tabela 50

FUE 11	285/834	milho	*Zea mays*	96,83	94,44
FUE 11	286/835	milho	*Zea mays*	95,24	94,44
FUE 11	287/836	milho	*Zea mays*	97,62	96,03
FUE 11	288/837	milho	*Zea mays*	97,62	96,03
FUE 11	289/838	milho	*Zea mays*	97,62	96,03
FUE 11	290/839	milho	*Zea mays*	98,41	96,83
FUE 11	291/840	milho	*Zea mays*	96,83	96,83
FUE 11	292/841	milho	*Zea mays*	97,62	97,62
FUE 11	293/842	milho	*Zea mays*	99,21	99,21
FUE 11	294/843	sorgo	*Sorgo bicolor*	91,27	85,71
FUE 11	295/844	sorgo	*Sorgo bicolor*	91,27	85,71
FUE 11	296/845	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	88,1	84,13
FUE 11	297/846.	trigo	*Triticum spp.*	96,03	95,24
FUE 12	298/847	milho	*Zea mays*	99,2	98,93
FUE 12	299/848	milho	*Zea mays*	99,47	99,2
FUE 12	300/849	milho	*Zea mays*	99,73	99,2
FUE 12	301/850	arroz	*Oryza sativa*	90,67	80,53
FUE 13	302/851	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 14	303/852	cevada	*Hordeum vulgare*	85,33	77,33
FUE 14	304/853	cevada	*Hordeum vulgare*	85,78	79,56
FUE 14	305/854	cevada	*Hordeum vulgare*	87,11	80,44
FUE 14	306/855	cevada	*Hordeum vulgare*	88,44	81,78
FUE 14	307/856	cevada	*Hordeum vulgare*	88,44	81,78
FUE 14	308/857	milho	*Zea mays*	85,78	75,11
FUE 14	309/858	milho	*Zea mays*	85,78	75,11
FUE 14	310/859	milho	*Zea mays*	86,22	76
FUE 14	311/860	milho	*Zea mays*	86,22	76
FUE 14	312/861	milho	*Zea mays*	87,11	78,22
FUE 14	313/862	milho	*Zea mays*	85,33	81,33
FUE 14	314/863	milho	*Zea mays*	92,44	88,44
FUE 14	315/864	milho	*Zea mays*	92,44	88,89
FUE 14	316/865	milho	*Zea mays*	92,89	88,89
FUE 14	317/866	milho	*Zea mays*	92,89	89,33
FUE 14	318/867	milho	*Zea mays*	93,33	89,33
FUE 14	319/868	milho	*Zea mays*	93,33	89,33
FUE 14	320/869	milho	*Zea mays*	94,67	90,22
FUE 14	321/870	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 14	322/871	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 14	323/872	arroz	*Oryza sativa*	85,33	73,33
FUE 14	324/873	arroz	*Oryza sativa*	85,33	73,33
FUE 14	325/874	arroz	*Oryza sativa*	85,33	74,22
FUE 14	326/875	arroz	*Oryza saliva*	85,33	74,22
FUE 14	327/876	arroz	*Oryza saliva*	88	77,78
FUE 14	328/877	arroz	*Oryza saliva*	88	77,78
FUE 14	329/878	arroz	*Oryza saliva*	85,78	79,56
FUE 14	330/879	arroz	*Oryza sativa*	85,78	79,56

125

Continuação da tabela 50					
FUE 14	331/880	arroz	*Oryza sativa*	86,67	80,89
FUE 14	332/881	arroz	*Oryza sativa*	86,67	81,33
FUE 14	333/882	arroz	*Oryza sativa*	86,67	81,33
FUE 14	334/883	arroz	*Oryza sativa*	88	81,78
FUE 14	335/884	arroz	*Oryza sativa*	87,56	81,78
FUE 14	336/885	arroz	*Oryza sativa*	88	81,78
FUE 14	337/886	arroz	*Oryza sativa*	87,56	81,78
FUE 14	338/887	arroz	*Oryza sativa*	87,56	82,22
FUE 14	339/888	arroz	*Oryza sativa*	87,56	82,22
FUE 14	340/889	arroz	*Oryza sativa*	87,56	82,67
FUE 14	341/890	arroz	*Oryza sativa*	87,56	82,67
FUE 14	342/891	arroz	*Oryza sativa*	88	83,11
FUE 14	343/892	arroz	*Oryza sativa*	88	83,11
FUE 14	344/893	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,22	76,44
FUE 14	345/894	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,22	76,44
FUE 14	346/895	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,22	77,33
FUE 14	347/896	sorgo	*Sorghumbicolor*	86,67	- - 77,78 -
FUE 14	348/897	sorgo	*Sorgo bicolor*	93,33	89,78
FUE 14	349/898	sorgo	*Sorgo bicolor*	93,78	89,78
FUE 14	350/899	sorgo	*Sorgo bicolor*	93,78	89,78
FUE 14	351/900	sorgo	*Sorgo bicolor*	93,78	90,22
FUE 14	352/901	sorgo	*Sorgo bicolor*	93,78	90,22
FUE 14	353/902	sorgo	*Sorgo bicolor*	94,67	90,67
FUE 14	354/903	trigo	*Triticum spp.*	87,11	80,44
FUE 14	355/904	trigo	*Triticum spp.*	88,89	80,89
FUE 14	356/905	trigo	*Triticum spp.*	87,56	81,33
FUE 14	357/906	trigo	*Triticum spp.*	87,11	81,33
FUE 14	358/907	trigo	*Triticum spp.*	88	81,78
FUE 14	359/908	trigo	*Triticum spp.*	89,33	81,78
FUE 14	360/909	trigo	*Triticum spp.*	90,22	83,11
FUE 14	361/910	trigo	*Triticum spp.*	89,33	83,11
FUE 15	362/911	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 15	363/912	sorgo	*Sorgo bicolor*	89,32	88,26
FUE 16	364/913	milho	*Zea mays*	88,21	83,59
FUE 16	365/914	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 16	366/915	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,69	83,59
FUE 17	367/916	cevada	*Hordeum vulgare*	88,84	79,68
FUE 17	368/917	cevada	*Hordeum vulgare*	88,84	79,68
FUE 17	369/918	milho	*Zea mays*	94,42	88,45
FUE 17	370/919	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 17	371/920	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 17	372/921	arroz	*Oryza sativa*	89,24	78,49
FUE 17	373/922	sorgo	*Sorgo bicolor*	96,02	92,03
FUE 17	374/923	trigo	*Triticum spp.*	88,45	79,28
FUE 17	375/924	trigo	*Triticum spp.*	89,64	80,08
FUE 30	376/925	milho	*Zea mays*	97,8	97,8

Continuação da tabela 50					
FUE 30	377/926	milho	*Zea mays*	98,31	97,97
FUE 30	378/927	milho	*Zea mays*	99,66	99,66
FUE 30	379/928	milho	*Zea mays*	99,83	99,83
FUE 30	380/929	milho	*Zea mays*	99,83	99,83
FUE 30	381/930	arroz	*Oryza saliva*	87,46	79,15
FUE 30	382/931	arroz	*Oryza sativa*	87,46	79,15
FUE 30	383/932	sorgo	*Sorgo bicolor*	91,69	85,93
FUE 30	384/933	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	92,03	87,29
FUE 31	385/934	milho	*Zea mays*	99,15	98,98
FUE 31	386/935	arroz	*Oryza sativa*	88,05	81,74
FUE 31	387/936	arroz	*Oryza sativa*	88,05	81,74
FUE 31	388/937	trigo	*Triticum spp.*	85,15	75,94
FUE 32	389/938	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 32	390/939	arroz	*Oryza sativa*	89,47	85,65
FUE 33	391/940	cevada	*Hordeum vulgare*	92,8	88,64
FUE 33	392/941	cevada	*Hordeum vulgare*	93,63	89,75
FUE 33	393/942	milho	*Zea mays*	99,72	99,72
FUE 33	394/943	milho	*Zea mays*	99,72	99,72
FUE 33	395/944	arroz	*Oryza sativa*	93,35	90,3
FUE 33	396/945	arroz	*Oryza sativa*	93,63	90,58
FUE 33	397/946	sorgo	*Sorgo bicolor*	85,32	75,35
FUE 33	398/947	sorgo	*Sorgo bicolor*	85,32	75,35
FUE 33	399/948	sorgo	*Sorgo bicolor*	97,51	96,68
FUE 33	400/949	sorgo	*Sorgo bicolor*	97,78	96,95
FUE 33	401/950	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	85,04	75,9
FUE 33	402/951	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	97,51	96,68
FUE 33	403/952	trigo	*Triticum spp.*	93,35	89,75
FUE 34 Evo	404/953	milho	*Zea mays*	96,25	94,58
FUE 34 Evo	405/954	milho	*Zea mays*	96,25	94,58
FUE 34 Evo	406/955	arroz	*Oryza sativa*	86,25	76,67
FUE 34 Evo	407/956	arroz	*Oryza sativa*	87,92	78,33
FUE 34 Evo	408/957	arroz	*Oryza sativa*	92,5	85,83
FUE 34 Evo	409/958	arroz	*Oryza sativa*	92,92	86,25
FUE 34 Evo	410/959	trigo	*Triticum spp.*	87,5	78,75
FUE 34 Pat	411/960	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 34 Pat	412/961	arroz	*Oryza sativa*	85,83	76,67
FUE 34 Pat	413/962	arroz	*Oryza sativa*	87,5	78,33
FUE 34 Pat	414/963	arroz	*Oryza sativa*	92,08	85,42
FUE 34 Pat	415/964	arroz	*Oryza sativa*	92,5	85,83
FUE 34 Pat	416/965	trigo	*Triticum spp.*	87,5	78,75
FUE 35	417/966	milho	*Zea mays*	98,41	96,03
FUE 35	418/967	milho	*Zea mays*	100	97,62
FUE 35	419/968	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 36	420/969	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	87,43	74,86
FUE 36	421/970	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	87,98	75,41
FUE 36	422/971	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	90,16	77,87

Continuação da tabela 50					
FUE 36	423/972	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	90,16	77,87
FUE 36	424/973	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	90,98	80,87
FUE 36	425/974	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	92,35	82,51
FUE 36	426/975	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	92,35	82,51
FUE 36	427/976	cevada	*Hordeum vulgare*	87,43	79,51
FUE 36	428/977	cevada	*Hordeum vulgare*	87,43	79,51
FUE 36	429/978	cevada	*Hordeum vulgare*	87,7	80,05
FUE 36	430/979	cevada	*Hordeum vulgare*	92,35	86,34
FUE 36	431/980	cevada	*Hordeum vulgare*	97,27	93,72
FUE 36	432/981	cevada	*Hordeum vulgare*	97,27	93,72
FUE 36	433/982	algodão	*Gossypium ssp.*	87,16	77,87
FUE 36	434/983	algodão	*Gossypium ssp.*	85,79	78,42
FUE 36	435/984	algodão	*Gossypium ssp.*	89,89	82,24
FUE 36	436/985	algodão	*Gossypium ssp.*	90,16	82,79
FUE 36	437/986	milho	*Zea mays*	91,8	84,97
FUE 36	438/987	milho	*Zea mays*	98,91	98,91
FUE 36	439/988	milho	*Zea mays*	98,91	98,91
FUE 36	440/989	milho	*Zea mays*	100	99,73
FUE 36	441/990	álamo	*Populus spp*	91,53	83,06
FUE 36	442/991	álamo	*Populus spp*	91,53	83,33
FUE 36	443/992	arroz	*Oryza sativa*	90,98	83,06
FUE 36	444/993	arroz	*Oryza sativa*	90,98	83,06
FUE 36	445/994	arroz	*Oryza sativa*	91,26	86,61
FUE 36	446/995	arroz	*Oryza sativa*	91,26	86,61
FUE 36	447/996	arroz	*Oryza sativa*	96,17	92,9
FUE 36	448/997	arroz	*Oryza sativa*	96,17	92,9
FUE 36	449/998	sorgo	*Sorgo bicolor*	92,62	87,16
FUE 36	450/999	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,18	99,18
FUE 36	451/1000	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,18	99,18
FUE 36	452/1001	soja	*Glycine max*	87,7	77,87
FUE 36	453/1002	soja	*Glycine max*	89,34	78,96
FUE 36	454/1003	soja	*Glycine max*	89,34	79,51
FUE 36	455/1004	soja	*Glycine max*	89,34	79,51
FUE 36	456/1005	soja	*Glycine max*	89,62	79,78
FUE 36	457/1006	soja	*Glycine max*	92,35	84,15
FUE 36	458/1007	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	98,91	98,63
FUE 36	459/1008	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	98,91	98,91
FUE 36	460/1009	girassol	*Helianthus annuus*	87,43	76,78
FUE 36	461/1010	tabaco	*Nicotiana spp.*	91,53	83,61
FUE 36	462/1011	tomate	*Solanum lycopersicum*	87,7	78,69
FUE 36	463/1012	tomate	*Solanum lycopersicum*	87,7	78,69
FUE 36	464/1013	tomate	*Solanum lycopersicum*	92,62	84,7
FUE 36	465/1014	trigo	*Triticum spp.*	86,89	80,05
FUE 36	466/1015	trigo	*Triticum spp.*	91,53	85,52
FUE 36	467/1016	trigo	*Triticum spp.*	97,27	93,99
FUE 37	468/1017	cevada	*Hordeum vulgare*	91,55	83,1

Continuação da tabela 50

FUE 37	469/1018	cevada	*Hordeum vulgare*	91,55	83,1
FUE 37	470/1019	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 37	471/1020	arroz	*Oryza sativa*	95,07	88,03
FUE 37	472/1021	arroz	*Oryza sativa*	95,07	88,03
FUE 37	473/1022	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	97,18	93,66
FUE 37	474/1023	trigo	*Triticum spp.*	91,55	83,1
FUE 38	475/1024	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	86,79	69,97
FUE 38	476/1025	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	86,79	69,97
FUE 38	477/1026	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	86,79	70,27
FUE 38	478/1027	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	85,89	73,27
FUE 38	479/1028	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	85,89	73,27
FUE 38	480/1029	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	85,89	73,27
FUE 38	481/1030	cevada	*Hordeum vulgare*	85,29	67,57
FUE 38	482/1031	cevada	*Hordeum vulgare*	85,29	67,57
FUE 38	483/1032	cevada	*Hordeum vulgare*	85,59	68,17
FUE 38	484/1033	cevada	*Hordeum vulgare*	85,89	69,37
FUE 38	485/1034	cevada	*Hordeum vulgare*	85,89	69,37
FUE 38	486/1035	cevada	*Hordeum vulgare*	86,19	71,17
FUE 38	487/1036	cevada	*Hordeum vulgare*	86,19	71,17
FUE 38	488/1037	cevada	*Hordeum vulgare*	85,59	73,87
FUE 38	489/1038	algodão	*Gossypium ssp.*	85,89	69,97
FUE 38	490/1039	algodão	*Gossypium ssp.*	85,29	69,97
FUE 38	491/1040	algodão	*Gossypium ssp.*	85,89	72,97
FUE 38	492/1041	algodão	*Gossypium ssp.*	87,09	72,97
FUE 38	493/1042	algodão	*Gossypium ssp.*	85,89	73,27
FUE 38	494/1043	algodão	*Gossypium ssp.*	86,79	73,87
FUE 38	495/1044	algodão	*Gossypium ssp.*	86,49	74,17
FUE 38	496/1045	algodão	*Gossypium ssp.*	89,79	77,48
FUE 38	497/1046	uva	*Vitis ssp.*	86,79	72,97
FUE 38	498/1047	uva	*Vitis ssp.*	86,79	72,97
FUE 38	499/1048	uva	*Vitis ssp.*	90,09	80,18
FUE 38	500/1049	milho	*Zea mays.*	85,29-	67,87
FUE 38	501/1050	milho	*Zea mays*	85,29	67,87
FUE 38	502/1051	milho	*Zea mays*	85,29	68,47
FUE 38	503/1052	milho	*Zea mays*	85,59	71,17
FUE 38	504/1053	milho	*Zea mays*	85,89	71,17
FUE 38	505/1054	milho	*Zea mays*	85,89	71,17
FUE 38	506/1055	milho	*Zea mays*	85,89	71,17
FUE 38	507/1056	milho	*Zea mays*	85,89	71,47
FUE 38	508/1057	milho	*Zea mays*	85,89	71,47
FUE 38	509/1058	milho	*Zea mays*	86,19	73,87
FUE 38	510/1059	milho	*Zea mays*	86,19	74,77
FUE 38	511/1060	milho	*Zea mays*	86,19	74,77
FUE 38	512/1061	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 38	513/1062	álamo	*Populus spp*	89,49	79,28
FUE 38	514/1063	álamo	*Populus spp*	89,49	79,88

179

Continuação da tabela 50					
FUE 38	515/1064	arroz	*Oryza sativa*	85,59	68,17
FUE 38	516/1065	arroz	*Oryza sativa*	85,59	68,17
FUE 38	517/1066	arroz	*Oryza sativa*	85,59	68,77
FUE 38	518/1067	arroz	*Oryza sativa*	85,59	68,77
FUE 38	519/1068	arroz	*Oryza sativa*	87,39	72,07
FUE 38	520/1069	arroz	*Oryza sativa*	87,39	72,07
FUE 38	521/1070	arroz	*Oryza sativa*	86,79	73,57
FUE 38	522/1071	arroz	*Oryza sativa*	86,79	73,57
FUE 38	523/1072	arroz	*Oryza sativa*	85,89	73,87
FUE 38	524/1073	arroz	*Oryza sativa*	85,89	73,87
FUE 38	525/1074	arroz	*Oryza sativa*	86,79	75,38
FUE 38	526/1075	arroz	*Oryza sativa*	86,79	75,38
FUE 38	527/1076	arroz	*Oryza sativa*	96,4	91,59
FUE 38	528/1077	arroz	*Oryza sativa*	96,4	91,59
FUE 38	529/1078	sorgo	*Sorgo bicolor*	85,29	67,87
FUE 38	530/1079	sorgo	*Sorgo bicolor*	85,29	67,87
FUE 38	531/1080	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,19	69,07
FUE 38	532/1081	sorgo	*Sorgo bicolor*	85,89	71,77
FUE 38	533/1082	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,39	72,07
FUE 38	534/1083	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,1	97,6
FUE 38	535/1084	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,1	97,6
FUE 38	536/1085	soja	*Glycine max*	85,29	67,27
FUE 38	537/1086	soja	*Glycine max*	85,29	67,87
FUE 38	538/1087	soja	*Glycine max*	85,89	69,67
FUE 38	539/1088	soja	*Glycine max*	86,49	71,47
FUE 38	540/1089	soja	*Glycine max*	86,79	71,77
FUE 38	541/1090	soja	*Glycine max*	85,89	72,67
FUE 38	542/1091	soja	*Glycine max*	85,29	73,27
FUE 38	543/1092	soja	*Glycine max*	86,79	74,17
FUE 38	544/1093	soja	*Glycine max*	86,79	74,17
FUE 38	545/1094	soja	*Glycine max*	85,59	75,38
FUE 38	546/1095	soja	*Glycine max*	88,29	77,78
FUE 38	547/1096	soja	*Glycine max*	88,29	78,08
FUE 38	548/1097	soja	*Glycine max*	88,89	78,38
FUE 38	549/1098	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	85,29	67,87
FUE 38	550/1099	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	86,49	72,07
FUE 38	551/1100	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	86,79	75-08
FUE 38	552/1101	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	99,4	97,9
FUE 38	553/1102	tabaco	*Nicotiana spp.*	86,79	72,97
FUE 38	554/1103	tabaco	*Nicotiana spp.*	86,79	72,97
FUE 38	555/1104	tabaco	*Nicotiana spp.*	87,39	75,38
FUE 38	556/1105	tabaco	*Nicotiana spp.*	87,99	76,28
FUE 38	557/1106	tabaco	*Nicotiana spp.*	87,99	76,28
FUE 38	558/1107	tomate	*Solanum lycopersicum*	86,19	69,67
FUE 38	559/1108	tomate	*Solanum lycopersicum*	86,49	72,37
FUE 38	560/1109	tomate	*Solanum lycopersicum*	90,69	78,38

180

Continuação da tabela 50

FUE 38	561/1110	tomate	*Solanum lycopersicum*	90,69	78,38
FUE 38	562/1111	trigo	*Triticum spp.*	85,59	68,17
FUE 38	563/1112	trigo	*Triticum spp.*	85,89	69,67
FUE 38	564/1113	trigo	*Triticum spp.*	86,19	71,17
FUE 38	565/1114	trigo	*Triticum spp.*	85,89	71,47
FUE 38	566/1115	trigo	*Triticum spp.*	85,89	71,47
FUE 38	567/1116	trigo	*Triticum spp.*	86,49	71,77
FUE 38	568/1117	trigo	*Triticum spp.*	85,59	73,57
FUE 38	569/1118	trigo	*Triticum spp.*	93,69	86,49
FUE 39	570/1119	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	91,93	81,17
FUE 39	571/1120	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	91,93	81,17
FUE 39	572/1121	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	91,93	81,17
FUE 39	573/1122	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	91,48	81,61
FUE 39	574/1123	Arabidopsis	*Arabidopsis tlialiana*	91,48	81,61
FUE 39	575/1124	canola	*Brassica ssp.*	90,13	79,82
FUE 39	576/1125	cevada	*Hordeum vulgare*	93,27	79,82
FUE 39	577/1126	cevada	*Hordeum vulgare*	93,27	79,82
FUE 39	578/1127	cevada	*Hordeum vulgare*	90,58	80,72
FUE 39	579/1128	cevada	*Hordeum vulgare*	90,58	80,72
FUE 39	580/1129	cevada	*Hordeum vulgare*	98,65	94,62
FUE 39	581/1130	cevada	*Hordeum vulgare*	98,65	94,62
FUE 39	582/1131	algodão	*Gossypium ssp.*	93,27	80,72
FUE 39	583/1132	algodão	*Gossypium ssp.*	93,27	81,61
FUE 39	584/1133	algodão	*Gossypium ssp.*	94,17	82,06
FUE 39	585/1134	algodão	*Gossypium ssp.*	94,62	82,06
FUE 39	586/1135	algodão	*Gossypium ssp.*	94,17	82,06
FUE 39	587/1136	algodão	*Gossypium ssp.*	94,17	82,96
FUE 39	588/1137	algodão	*Gossypium ssp.*	95,07	83,86
FUE 39	589/1138	uva	*Vitis ssp.*	93,72	82,96
FUE 39	590/1139	uva	*Vitis ssp.*	93,27	82,96
FUE 39	591/1140	uva	*Vitis ssp.*	93,72	82,96
FUE 39	592/1141	milho	*Zea mays*	94,62	78,92
FUE 39	593/1142	milho	*Zea mays*	93,27	79,82
FUE 39	594/1143	milho	*Zea mays*	92,83	80,27
FUE 39 .	595/1144	milho	*Zea mays*	93,27	80,72
FUE 39	596/1145	milho	*Zea mays*	94,17	80,72
FUE 39	597/1146	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 39	598/1147	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 39	599/1148	pêssego	*Prunus persica*	93,27	81,17
FUE 39	600/1149	álamo	*Populus spp*	93,27	82,06
FUE 39	601/1150	álamo	*Populus spp*	93,27	82,06
FUE 39	602/1151	álamo	*Populus spp*	92,38	82,51
FUE 39	603/1152	_álamo	*Populus spp*	94,17	82,96
FUE 39	604/1153	álamo	*Populus spp*	94,17	82,96
FUE 39	605/1154	arroz	*Oryza sativa*	94,62	80,72
FUE 39	606/1155	arroz	*Oryza sativa*	94,62	81,17

181

Continuação da tabela 50					
FUE 39	607/1156	arroz	*Oryza sativa*	93,72	82,96
FUE 39	608/1157	arroz	*Oryza sativa*	93,72	82,96
FUE 39	609/1158	arroz	*Oryza sativa*	95,07	91,93
FUE 39	610/1159	arroz	*Oryza sativa*	95,07	91,93
FUE 39	611/1160	sorgo	*Sorgo bicolor*	95,52	81,17
FUE 39	612/1161	sorgo	*Sorgo bicolor*	95,52	81,17
FUE 39	613/1162	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,55	98,65
FUE 39	614/1163	soja	*Glycine max*	93,72	82,51
FUE 39	615/1164	soja	*Glycine max*	93,72	82,51
FUE 39	616/1165	soja	*Glycine max*	94,62	83,41
FUE 39	617/1166	soja	*Glycine max*	94,62	83,41
FUE 39	618/1167	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	94,17	81,61
FUE 39	619/1168	girassol	*Helianthus annuus*	91,03	77,13
FUE 39	620/1169	girassol	*Helianthus annuus*	93,27	82,96
FUE 39	621/1170	tabaco	*Nicotiana spp.*	87	77,58
FUE 39	622/1171	tabaco	*Nicotiana spp.*	89,69	78,92
FUE 39	623/1172	tabaco	*Nicotiana spp.*	92,83	82,51
FUE 39	624/1173	tomate	*Solanum lycopersicum*	89,69	79,82
FUE 39	625/1174	tomate	*Solanum lycopersicum*	91,48	81,17
FUE 39	626/1175	tomate	*Solanum lycopersicum*	92,38	82,51
FUE 39	627/1176	trigo	*Triticum spp.*	93,27	79,82
FUE 39	628/1177	trigo	*Triticum spp.*	92,83	82,96
FUE 39	629/1178	trigo	*Triticum spp.*	99,1	94,62
FUE 41	630/1179	milho	*Zea mays*	98,76	98,76
FUE 41	631/1180	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 41	632/1181	sorgo	*Sorgo bicolor*	96,27	92,55
FUE 41	633/1182	sorgo	*Sorgo bicolor*	96,89	93,79
FUE 41	634/1183	sorgo	*Sorgo bicolor*	96,89	93,79
FUE 43	635/1184	cevada	*Hordeum vulgare*	91,27	85,71
FUE 43	636/1185	cevada	*Hordeum vulgare*	91,27	85,71
FUE 43	637/1186	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 43	638/1187	arroz	*Oryza sativa*	90,48	85,71
FUE 43	639/1188	arroz	*Oryza sativa*	90,48	85,71
FUE 43	640/1189	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,21	97,62
FUE 43	641/1190	sorgo	*Sorgo bicolor*	99,21	97,62
FUE 43	642/1191	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	86,51	85,71
FUE 43	643/1192	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	98,41	97,62
FUE 43	644/1193	trigo	*Triticum spp.*	91,27	85,71
FUE 44	645/1194	cevada	*Hordeum vulgare*	87,72	83,04
FUE 44	646/1195	cevada	*Hordeum vulgare*	88,3	84,21
FUE 44	647/1196	milho	*Zea mays*	98,83	98,25
FUE 44	648/1197	arroz	*Oryza sativa*	90,06	80,7
FUE 44	649/1198	arroz	*Oryza sativa*	91,81	85,38
FUE 44	650/1199	sorgo	*Sorgo bicolor*	86,55	82,46
FUE 44	651/1200	sorgo	*Sorgo bicolor*	96,49	91,81
FUE 44	652/1201	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	93,57	86,55

182

Continuação da tabela 50

FUE 44	653/1202	cana de açúcar	*Saccharum officinarum* .	94,74	87,72 -
FUE 44	654/1203	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	97,08	91,81
FUE 44	655/1204	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	97,08	92,4
FUE 44	656/1205	trigo	*Triticum spp.*	87,72	83,63
FUE 44	657/1206	trigo	*Triticum spp.*	88,89	84,21
FUE 44	658/1207	trigo	*Triticum spp.*	88,89	84,8
FUE 44	659/1208	trigo	*Triticum spp.*	90,64	85,96
FUE 45	660/1209	cevada	*Hordeum vulgare*	86,83	78,44
FUE 45	661/1210	cevada	*Hordeum vulgare*	86,83	78,44
FUE 45	662/1211	milho	*Zea mays*	98,2	94,01
FUE 45	663/1212	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 45	664/1213	arroz	*Oryza sativa*	88,62	80,24
FUE 45	665/1214	arroz	*Oryza sativa*	88,62	80,24
FUE 45	666/1215	sorgo	*Sorgo bicolor*	100	98,2
FUE 45	667/1216	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	100	98,2
FUE 45	668/1217	trigo	*Triticum spp.*	85,03	76,65
FUE 45	669/1218	trigo	*Triticum spp.*	85,03	77,25
FUE 45	670/1219	trigo	*Triticum spp.*	85,03	77,25
FUE 45	671/1220	trigo	*Triticum spp.*	85,63	77,84
FUE 45	672/1221	trigo	*Triticum spp.*	97,01	95,21
FUE 46	673/1222	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 47	674/1223	milho	*Zea mays*	89,72	85,77
FUE 47	675/1224	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 47	676/1225	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 47	677/1226	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 47	678/1227	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	88,14	86,17
FUE 48	679/1228	cevada	*Hordeum vulgare*	89,29	81,75
FUE 48	680/1229	milho	*Zea mays*	86,24	79,76
FUE 48	681/1230	milho	*Zea mays*	99,21	99,07
FUE 48	682/1231	milho	*Zea mays*	99,34	99,21
FUE 48	683/1232	arroz	*Oryza sativa*	86,64	79,23
FUE 48	684/1233	arroz	*Oryza sativa*	86,64	79,23
FUE 48	685/1234	arroz	*Oryza sativa*	86,64	79,23
FUE 48	686/1235	arroz	*Oryza sativa*	90,34	84,26
FUE 48	687/1236	arroz	*Oryza sativa*	90,34	84,26
FUE 48	688/1237	sorgo	*Sorgo bicolor*	94,05	90,61
FUE 48	689/1238	sorgo	*Sorgo bicolor*	94,05	90,61
FUE 48	690/1239	trigo	*Triticum spp.*	89,68	81,35
FUE 48	691/1240	trigo	*Triticum spp.*	89,42	81,61
FUE 49	692/1241	milho	*Zea mays*	96,03	92,82
FUE 49	693/1242	milho	*Zea mays*	98,11	97,35
FUE 49	694/1243	milho	*Zea mays*	99,24	98,68
FUE 49	695/1244	arroz	*Oryza sativa*	89,04	81,1
FUE 49	696/1245	arroz	*Oryza sativa*	89,04	81,1
FUE 49	697/1246	trigo	*Triticum spp.*	86,96	77,13
FUE 49	698/1247	trigo	*Triticum spp.*	87,33	77,32

183

Continuação da tabela 50					
FUE 50	699/1248	milho	*Zea mays*	99,73	99,73
FUE 50	700/1249	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	91,42	88,2
FUE 50	701/1250	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	92,49	89,28
FUE 51	702/1251	cevada	*Hordeum vulgare*	91,5	84,75
FUE 51	703/1252	cevada	*Hordeum vulgare*	91,5	84,75
FUE 51	704/1253	cevada	*Hordeum vulgare*	94,121	88,45 -
FUE 51	705/1254	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 51	706/1255	arroz	*Oryza sativa*	92,59	85,4
FUE 51	707/1256	arroz	*Oryza sativa*	92,59	85,4
FUE 51	708/1257	arroz	*Oryza sativa*	95,86	93,46
FUE 51	709/1258	arroz	*Oryza sativa*	96,08	93,68
FUE 51	710/1259	sorgo	*Sorgo bicolor*	92,16	83,22
FUE 51	711/1260	sorgo	*Sorgo bicolor*	92,16	83,22
FUE 51	712/1261	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	92,16	83,88
FUE 51	713/1262	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	98,91	98,26
FUE 51	714/1263	trigo	*Triticum spp.*	91,29	84,97
FUE 51	715/1264	trigo	*Triticum spp.*	94,77	88,89
FUE 52	716/1265	cevada	*Hordeum vulgare*	89,35	83,8
FUE 52	717/1266	cevada	*Hordeum vulgare*	89,35	83,8
FUE 52	718/1267	milho	*Zea mays*	100	99,77
FUE 52	719/1268	milho	*Zea mays*	100	99,77
FUE 52	720/1269	arroz	*Oryza sativa*	90,05	85,88
FUE 52	721/1270	arroz	*Oryza sativa*	90,05	86,11
FUE 52	722/1271	arroz	*Oryza sativa*	90,05	86,11
FUE 52	723/1272	sorgo	*Sorgo bicolor*	93,06	90,97
FUE 52	724/1273	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	94,68	92,82
FUE 52	725/1274	trigo	*Triticum spp.*	89,35	83,33
FUE 53	726/1275	cevada	*Hordeum vulgare*	86,86	73,73
FUE 53	727/1276	milho	*Zea mays*	95,98	94,37
FUE 53	728/1277	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 53	729/1278	arroz	*Oryza sativa*	93,57	86,86
FUE 53	730/1279	arroz	*Oryza sativa*	93,57	86,86
FUE 53	731/1280	trigo	*Triticum spp.*	89,54	80,43
FUE 54	732/1281	milho	*Zea mays*	90,94	88,77
FUE 54	733/1282	milho	*Zea mays*	96,74	96,74
FUE 54	734/1283	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,32	83,7
FUE 54	735/1284	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,32	83,7
FUE 54	736/1285	sorgo	*Sorgo bicolor*	90,22	86,59
FUE 54	737/1286	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	90,94	87,32
FUE 54	738/1287	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	90,94	87,32 ,
FUE 55	739/1288	milho	*Zea mays*	92,31	89,62
FUE 100	740/1289	cevada	*Hordeum vulgare*	88,89	81,77
FUE 100	741/1290	cevada	*Hordeum vulgare*	88,89	81,77
FUE 100	742/1291	milho	*Zea mays*	85,19	74,64
FUE 100	743/1292	milho	*Zea mays*	85,19	74,64
FUE 100	744/1293	milho	*Zea mays*	98,29	98,01

Continuação da tabela 50					
FUE 100	745/1294	milho	*Zea mays*	99,72	99,72
FUE 100	746/1295	arroz	*Oryza sativa*	86,61	78,92
FUE 100	747/1296	arroz	*Oryza sativa*	86,61	78,92
FUE 100	748/1297	sorgo	*Sorgo bicolor*	85,19	74,93
FUE 100	749/1298	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,46	78,06
FUE 100	750/1299	sorgo	*Sorgo bicolor*	87,46	78,06
FUE 100	751/1300	sorgo	*Sorgo bicolor*	92,02	88,03
FUE 100	752/1301	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	89,17	78,63
FUE 100	753/1302	cana de açúcar	*Saccharum officinarum*	91,45	87,75
FUE 100	754/1303	trigo	*Triticum spp.*	87,18	79,77
FUE 101	755/1304	milho	*Zea mays*	100	100
FUE 101	756/1305	arroz	*Oryza sativa*	91,76	84,82
FUE 101	757/1306	arroz	*Oryza sativa*	91,76	84,82
FUE 102	758/1307	milho	*Zea mays*	87,2	83,65
FUE 102	759/1308	milho	*Zea mays*	94,31	93,84
FUE 102	760/1309	milho	*Zea mays*	96,21	96,21
FUE 501	761/1310	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	87,13	75,86
FUE 501	762/1311	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	87,59	76,55
FUE 501	763/1312	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	100	100
FUE 502	764/1313	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	100	100
FUE 503	765/1314	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	100	100
FUE 504	766/1315	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	100	100
FUE 505	767/1316	Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	100	100

É apreciado que determinadas características da invenção, que são, para clareza, descritas no contexto de configurações separadas, também podem ser fornecidas em combinação em uma única configuração. De forma oposta, diversas características da invenção, que são, para brevidade, descritas no contexto de uma única configuração, podem também ser fornecidas separadamente ou em qualquer sub-combinação adequada.

Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com suas configurações, fica evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão aparentes para aqueles com habilidade na técnica. De forma correspondente, tem a intenção de abranger todas as tais alternativas, modificações e variações que ficam dentro do

espírito e amplo escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente e números de Acessão de GenBank mencionados nesta especificação são neste ato incorporados em sua totalidade na especificação, na mesma medida como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual ou número de Acessão de GenBank estava especificamente e individualmente indicado como sendo aqui incorporado por referência. Além disso, a citação ou identificação de qualquer referência neste pedido não será interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível como técnica anterior da presente invenção.

Legendas das figuras

FIGURA 1a

A	Seca induz o desenvolvimento do sistema radicular
B	Totalmente irrigada
C	Levemente irrigada
D	Sistema radicular do milho em cerca de 8 semanas

FIGURA 1b

E	Abordagem de prospecção de dados utilizada para descoberta de gene
F	Eficiência do Uso de Fertilizante / Tolerância ao Estresse Abiótico
G	Aumento da capacidade de disparo submersão
H	Remodelar a arquitetura radicular
I	Genes relacionados ao nitrogênio
J	Genes específicos de disparo
K	Genes associados à seca
L	Genes específicos da raiz

FIGURA 6

U1	Quantificação da área de roseta de planta usando Análise de Imagem Digital
U2	Imagem original
U3	Imagem processada
U4	Análise da imagem
U5	Tabela de resultados

FIGURA 8

Y1	A Expressão Evo provoca ramificação de planta intensificada

REIVINDICAÇÕES

1. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UMA CONDIÇÃO DE ESTRESSE ABIÓTICO", caracterizado pelo fato de que compreende expressar exogenamente dentro da planta uma sequência de ácido nucleico definida pela SEQ ID NO: 1331, que codifica o polipeptídeo que possui a sequência de aminoácido descrita na SEQ ID NO: 167, ou uma sequência degenerada da SEQ ID NO: 1331 que codifica o dito polipeptídeo que possui a sequência de aminoácido descrita na SEQ ID NO: 167, assim aumentando a tolerância de uma planta à condição de estresse abiótico.

2. "MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, O VIGOR, E/OU O RENDIMENTO DE UMA PLANTA", caracterizado pelo fato de que compreende expressar exogenamente dentro da planta uma sequência de ácido nucleico definida pela SEQ ID NO: 1331, que codifica o polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 167, ou uma sequência degenerada da SEQ ID NO: 1331 que codifica o dito polipeptídeo que possui a sequência de aminoácido descrita na SEQ ID NO: 167, assim aumentando a biomassa, o vigor e/ou o rendimento de uma planta.

3. "MÉTODO PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE USO DE FERTILIZANTE E/OU ABSORÇÃO DE UMA PLANTA", caracterizado pelo fato de que compreende expressar exogenamente dentro da planta

uma sequência de ácido nucleico definida pela SEQ ID NO: 1331, que codifica o polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 167, ou uma sequência degenerada da SEQ ID NO: 1331, que codifica o dito polipeptídeo que possui a sequência de aminoácido descrita na SEQ ID NO: 167, assim aumentando a eficiência de uso de fertilizante e/ou a captação de uma planta.

4. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido estresse abiótico é selecionado do grupo consistindo de salinidade, seca, temperatura baixa, temperatura alta, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, osmótico e deficiência de nutriente.

5. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido estresse abiótico é selecionado do grupo consistindo de salinidade, seca, osmótico e deficiência de nutriente.

6. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido estresse abiótico é selecionado do grupo consistindo de salinidade e osmótico.

7. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que referido nutriente é nitrogênio.

8. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a

referida sequência de ácido nucleico é selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NOs: 1331 e 58.

9. "MÉTODO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida condição é uma condição de deficiência de fertilizante.

190

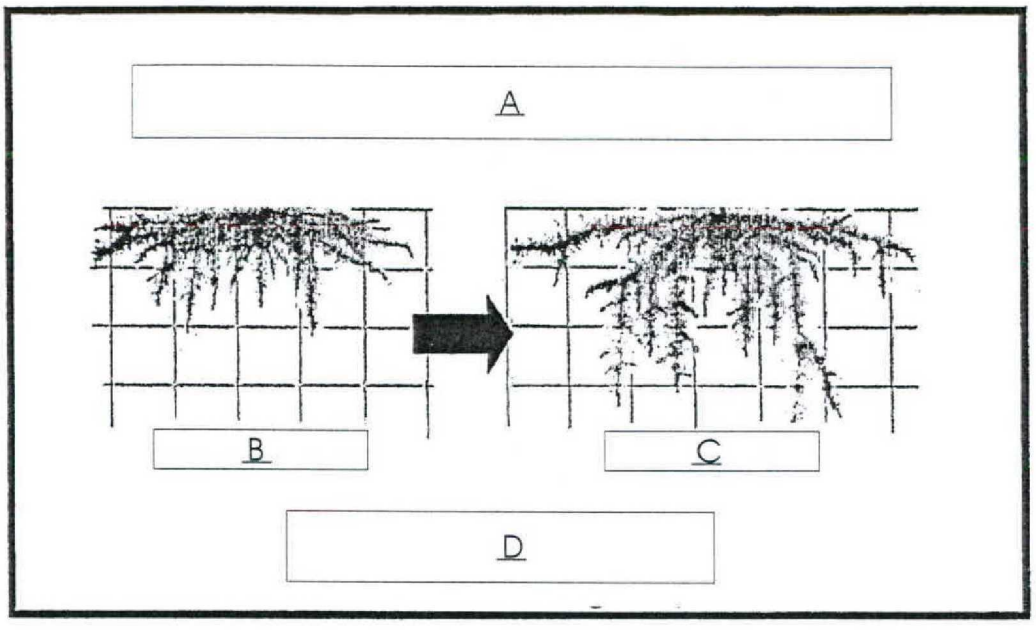


FIG.1A

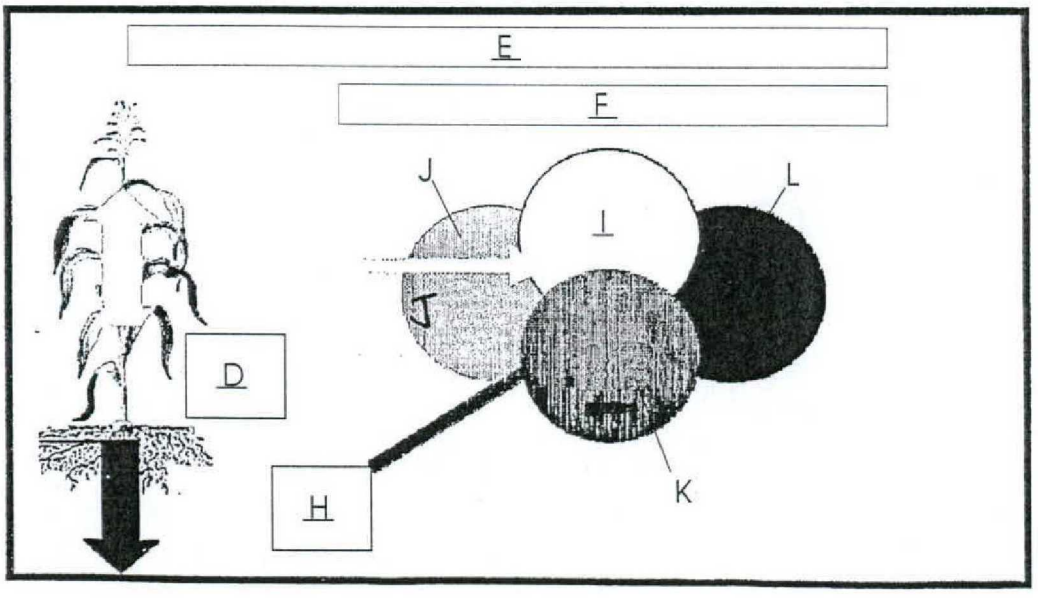


FIG.1B

LEGENDA	PALAVRA-CHAVE	ESTs NO GENE	ESTs NO PRODUÇÃO	ESTs ESPERADOS	DOBRA	VALOR P
	FLOR	**4**	**89278**	**10.8145**	**0.369873**	**0.997498**
	MUDA+FLOR FÊMEA	4	9012	1.09165	3.66417	0.0234977
	FOLHA	**1**	**35689**	**4.32312**	**0.231314**	**0.989277**
	ORELHA-FOLHA	1	7960	1	1	0.622546
	MISTURA	**2**	**90046**	**10.9076**	**0.183359**	**0.999938**
	RAIZ	**37**	**36059** DOBRA	**4.36794**	**8.47082**	**1.77636E-15**
	SISTEMA REDICULAR PRIMARIO	24	33886	4.10472	5.84693	7.81597E-14
	PONTA DE RAIZ	13	2173	1	13	2.22045E-15
	MUDA	**6**	**32466**	**3.93271**	**1.52567**	**0.19702**
	MUDA+FLOR FÊMEA	4	9012	1.09165	3.66417	0.0234977
	DISPARO	1	16152	1.95654	0.511106	0.864469

FIG.2A

192

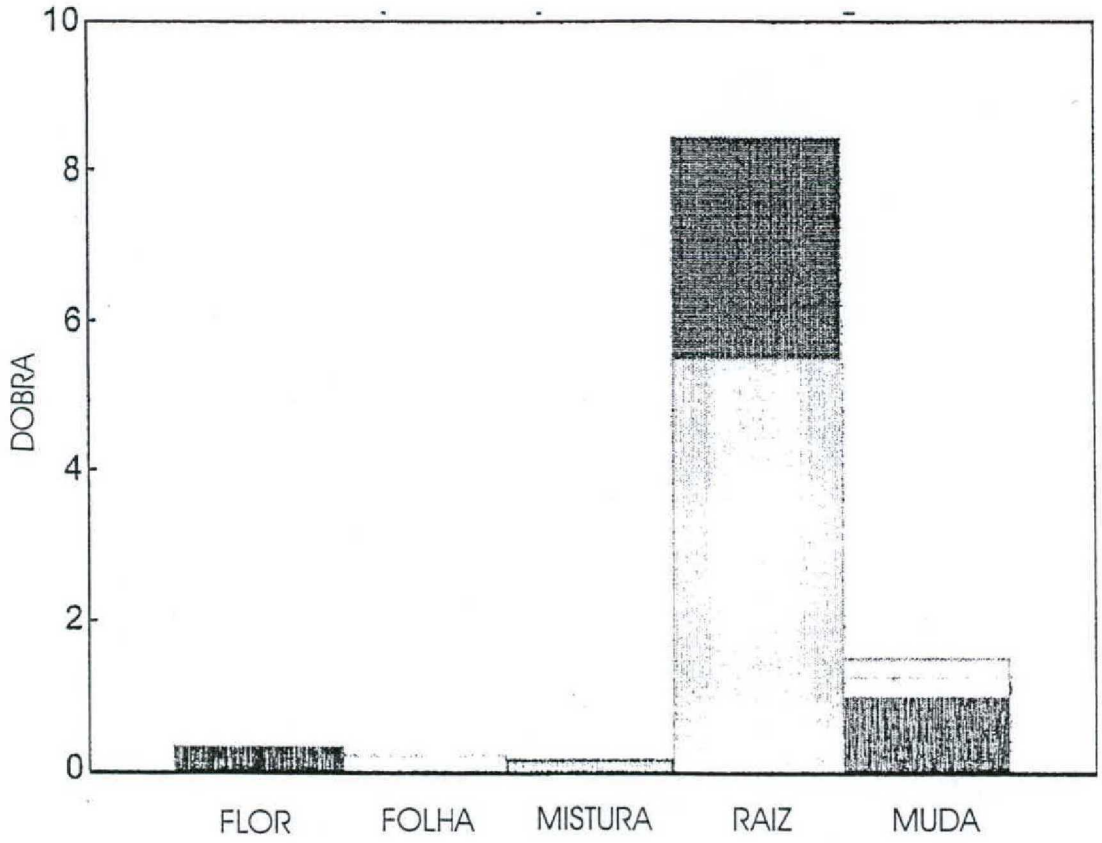


FIG.2B

	CALO	CÂMBIO	SUSPENSÃO DE CÉLULA	FLOR	SEMENTE DE GERMINAÇÃO	FLOR	MIS-TURA	FLOEMA	VA-GEM	RAIZ	MUDA
ALGODÃO											0.26
UVA				0.39							
MILHO				0.07		0.06	0.4			2.61	0.2
ÁLAMO		2.8						4.1			
ARROZ					0.9	0.08				5.25	1.24
SORGO	0.46		2								0.21
SOJA									1	0.31	0.11
TOMATE	1.46										
TOTAL	**1.92**	**2.8**	**2**	**0.47**	**0.9**	**0.14**	**0.4**	**4.1**	**1**	**8.17**	**2.02**

FIG.2C

194

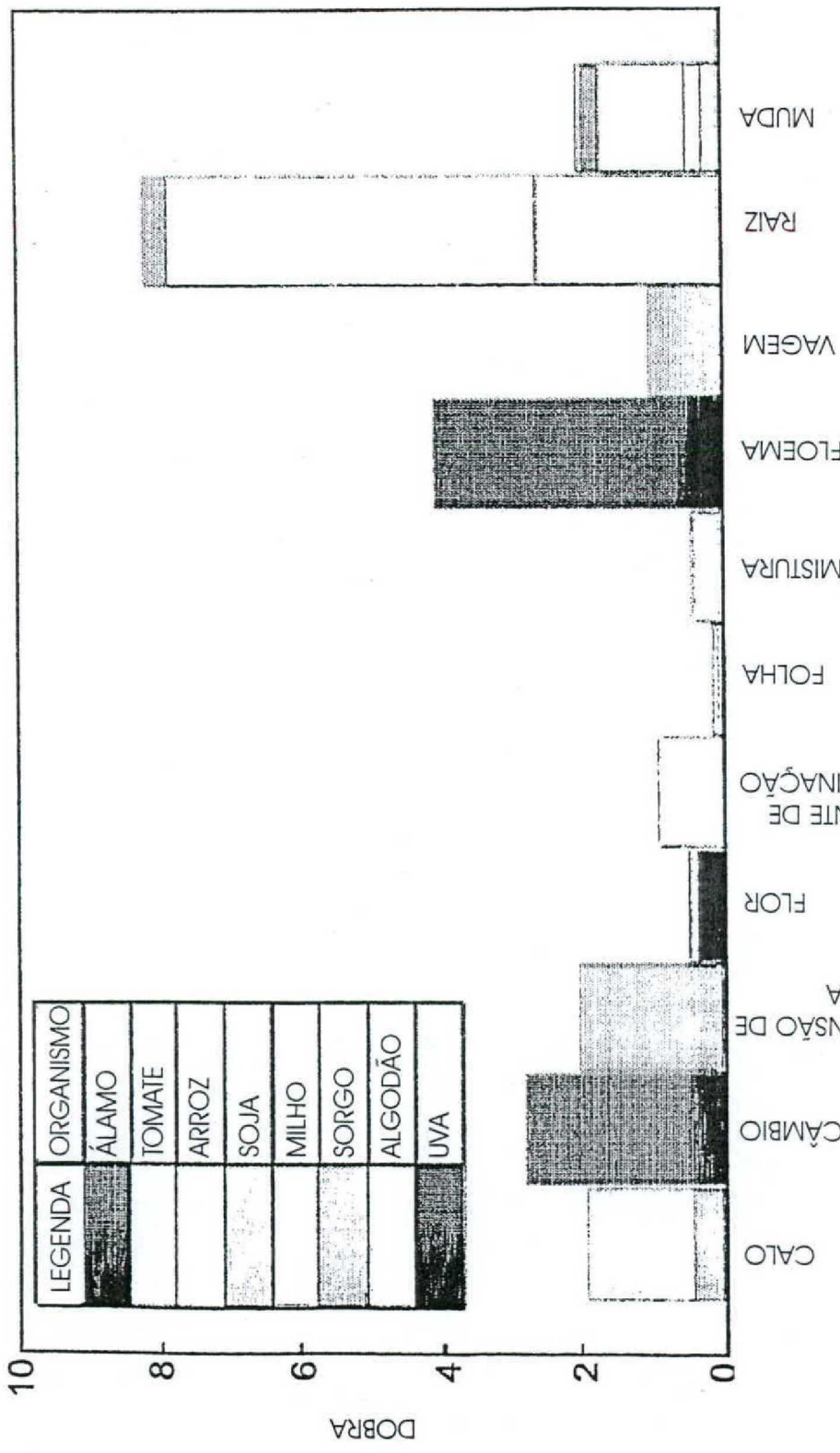

LEGENDA
ORGANISMO
ÁLAMO
TOMATE
ARROZ
SOJA
MILHO
SORGO
ALGODÃO
UVA
DOBRA
0
2
4
6
8
10
CALO
CÂMBIO
SUSPENSÃO DE CÉLULA
FLOR
SEMENTE DE GERMINAÇÃO
FOLHA
MISTURA
FLOEMA
VAGEM
RAIZ
MUDA

FIG.2D

195
8

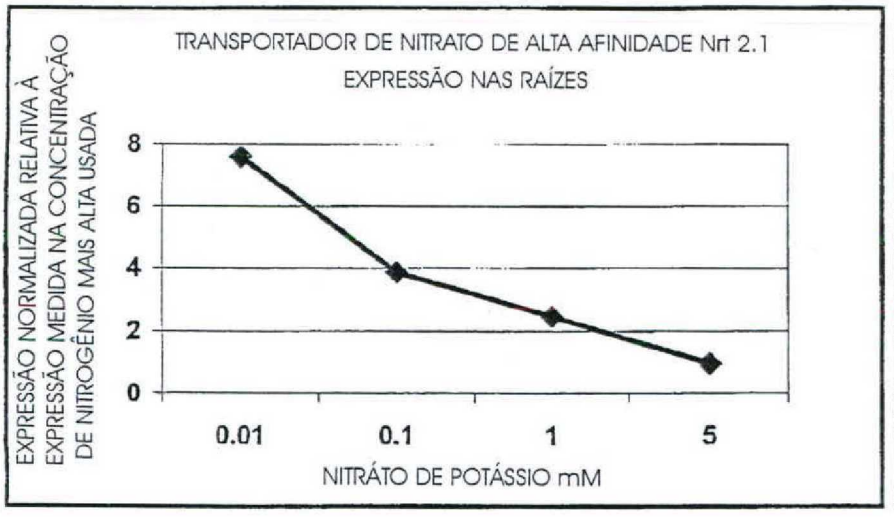


FIG.3A

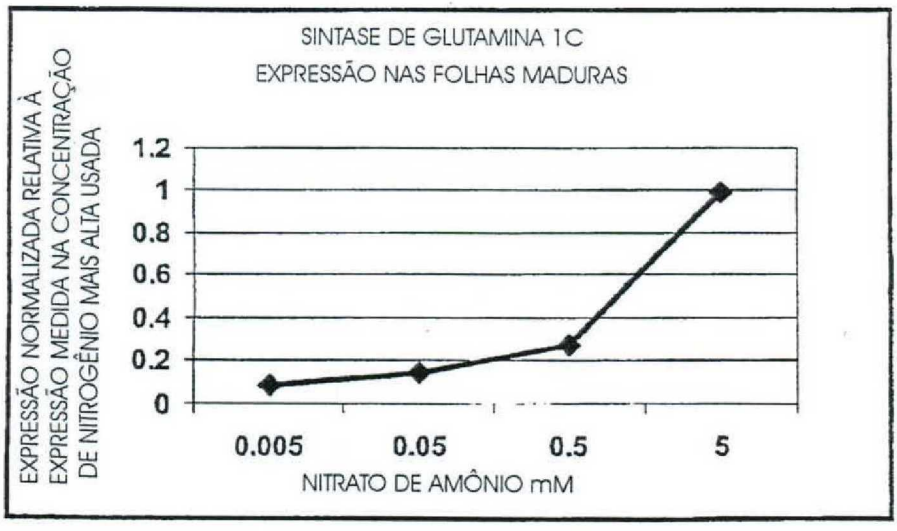


FIG.3C

196

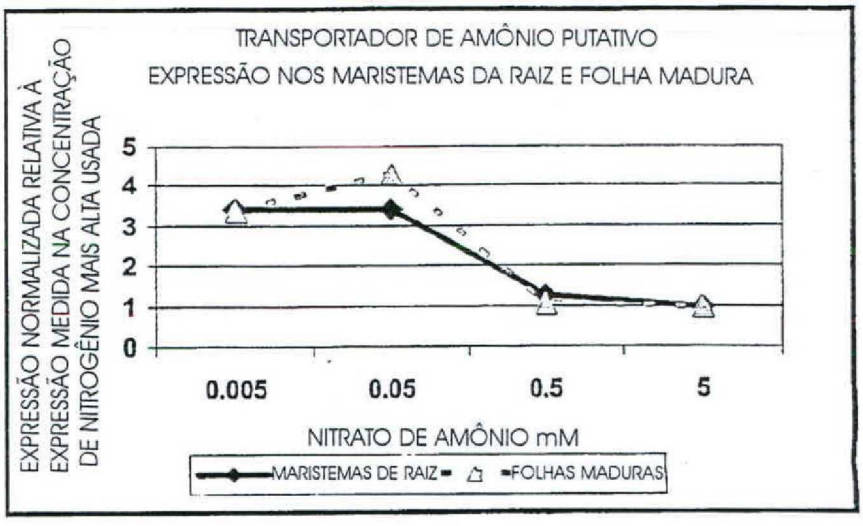


FIG.3B

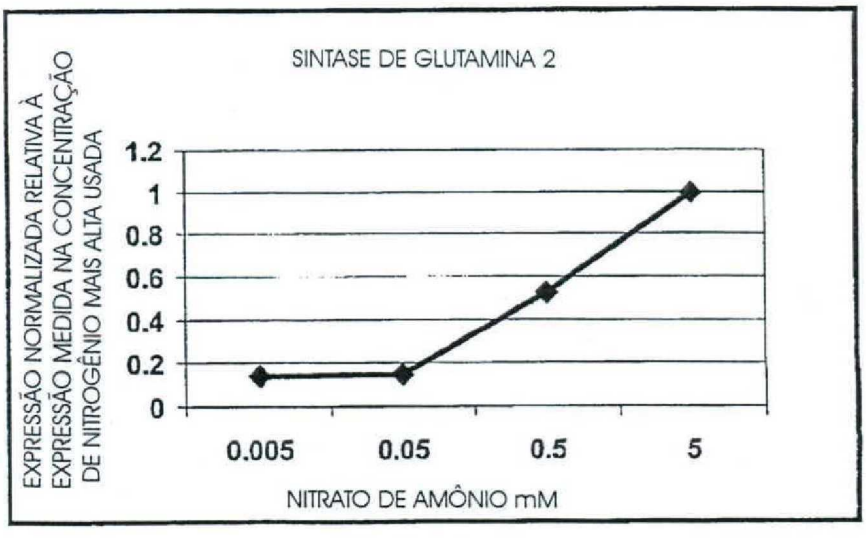


FIG.3D

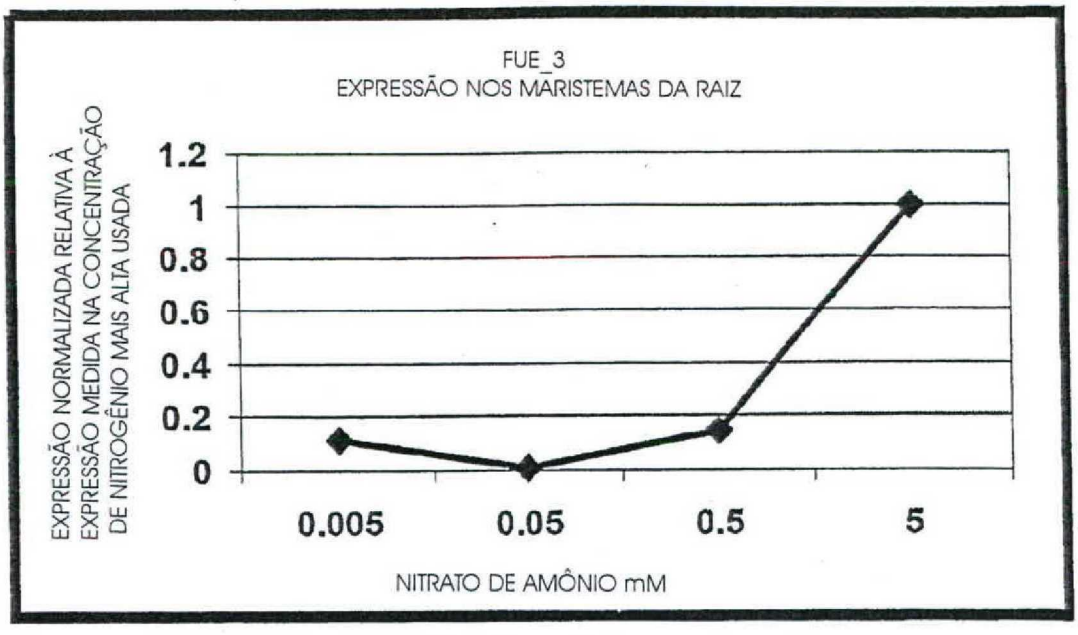

FUE_3
EXPRESSÃO NOS MARISTEMAS DA RAIZ
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.4A

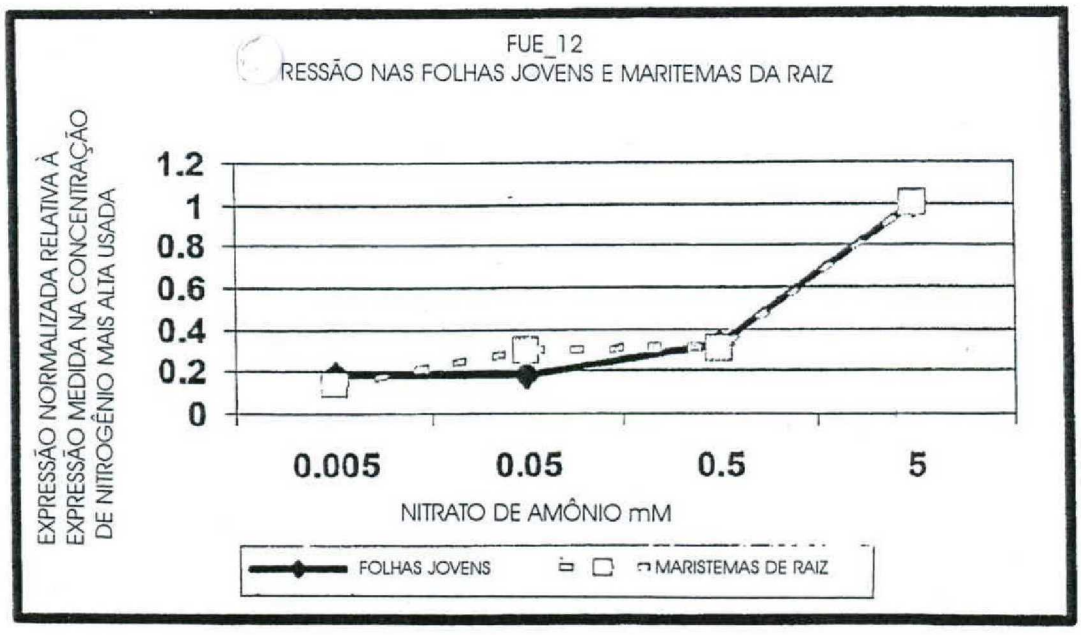

FUE_12
RESSÃO NAS FOLHAS JOVENS E MARITEMAS DA RAIZ
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM
FOLHAS JOVENS
MARISTEMAS DE RAIZ

FIG.4B

198

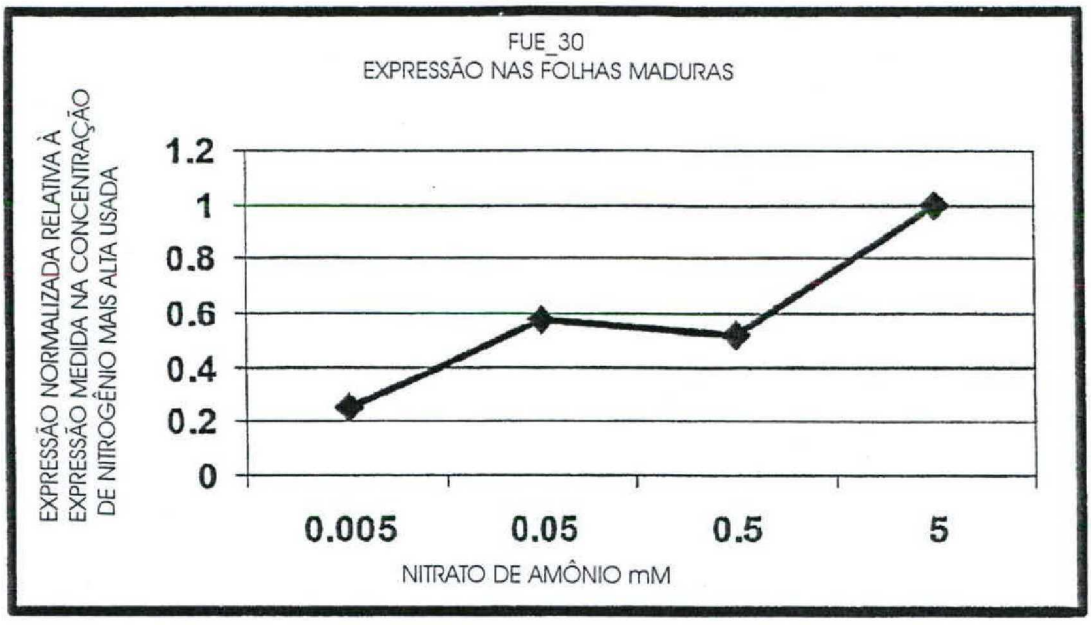


FIG.4C

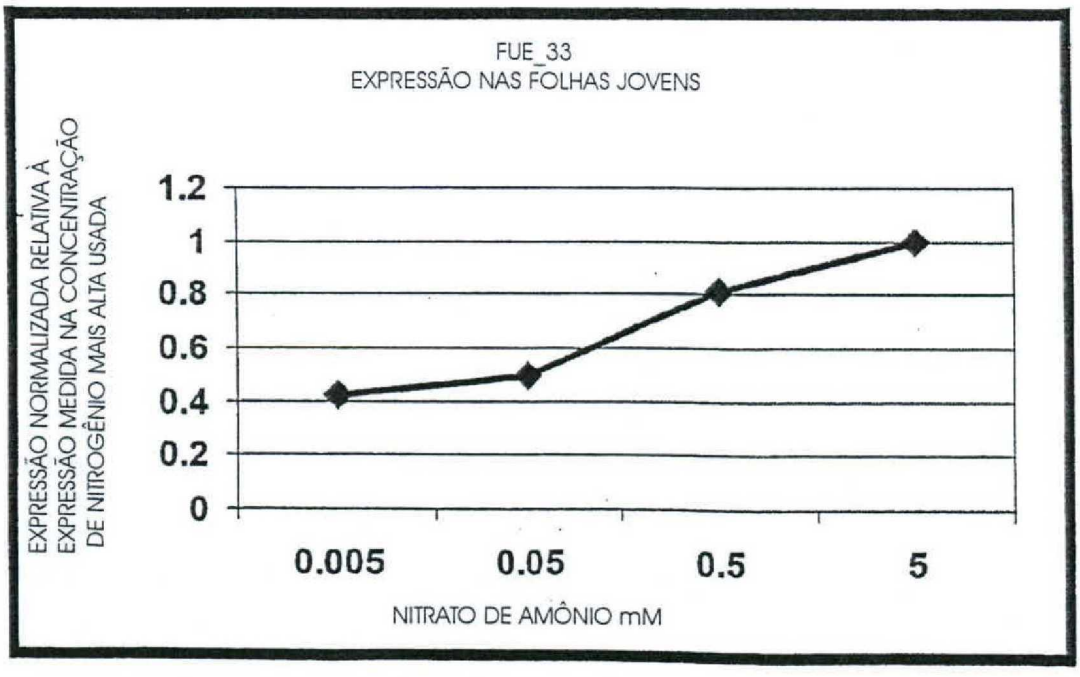


FIG.4D

199

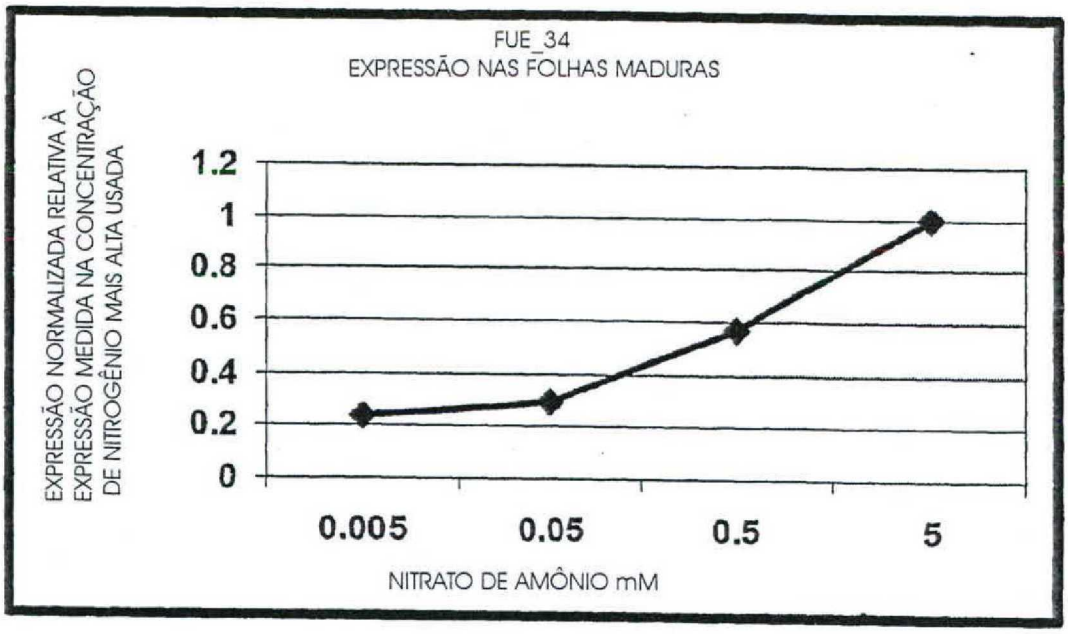


FIG.4E

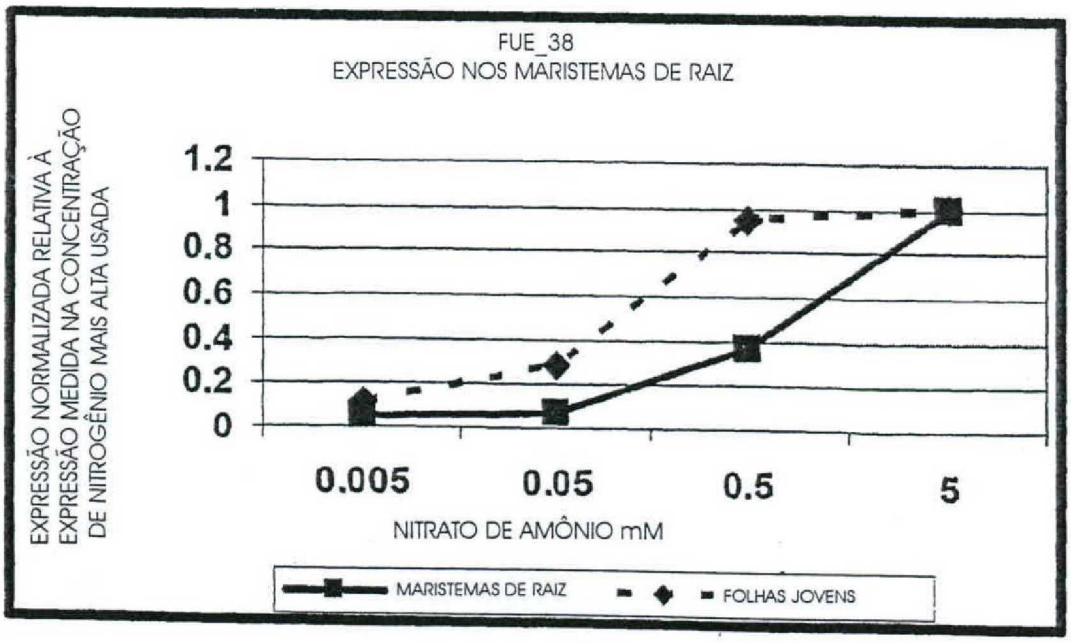


FIG.4F

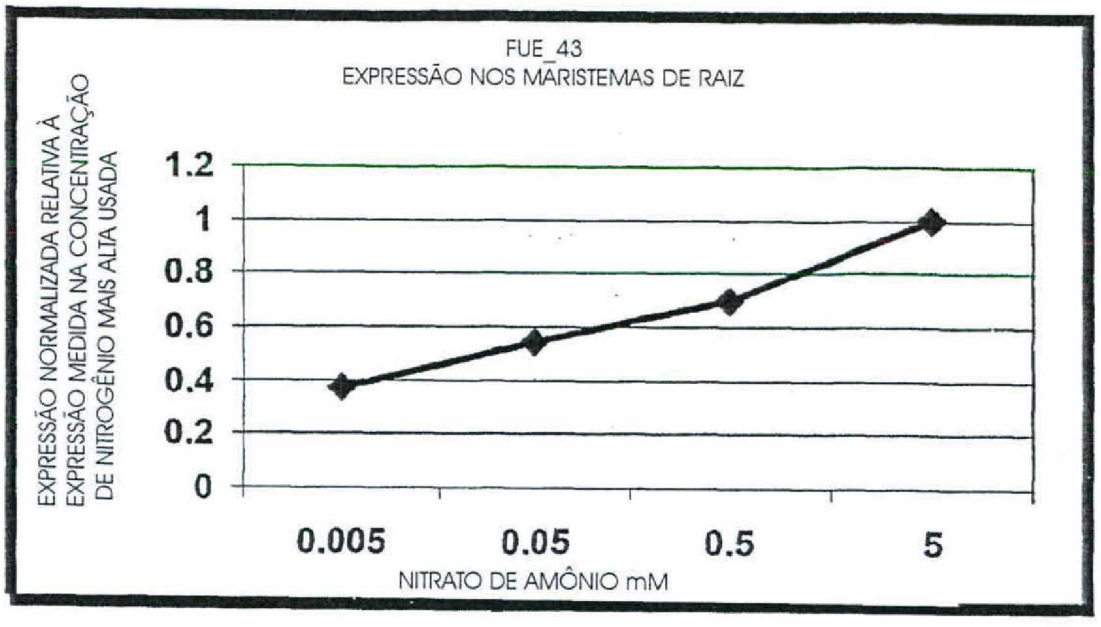

FUE_43
EXPRESSÃO NOS MARISTEMAS DE RAIZ
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.4G

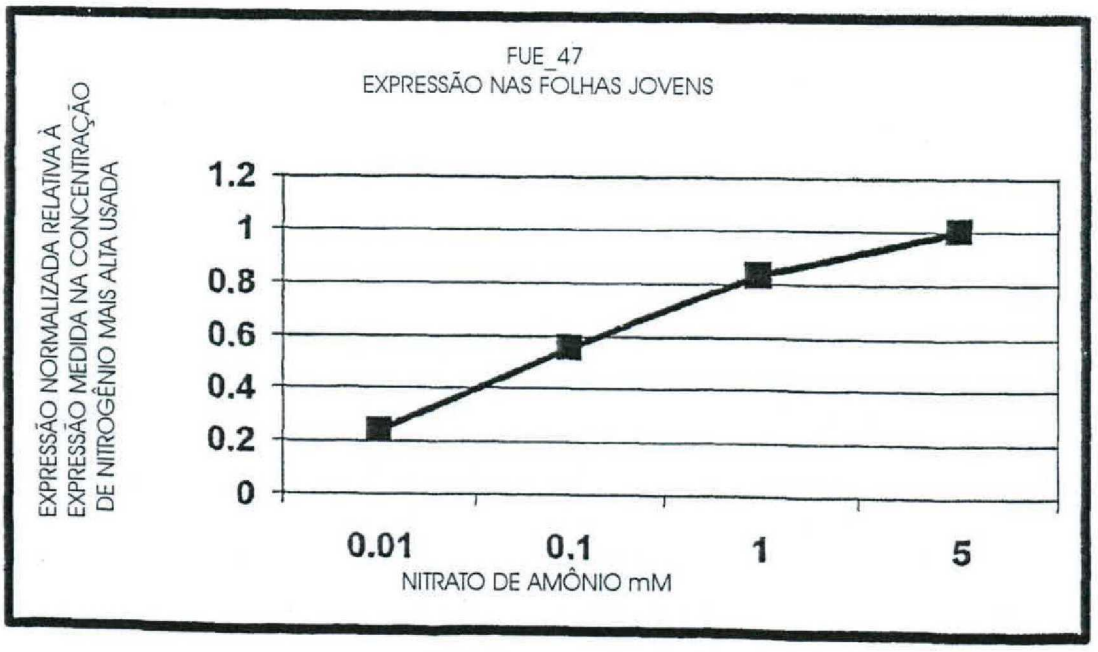

FUE_47
EXPRESSÃO NAS FOLHAS JOVENS
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
0.1
1
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.4H

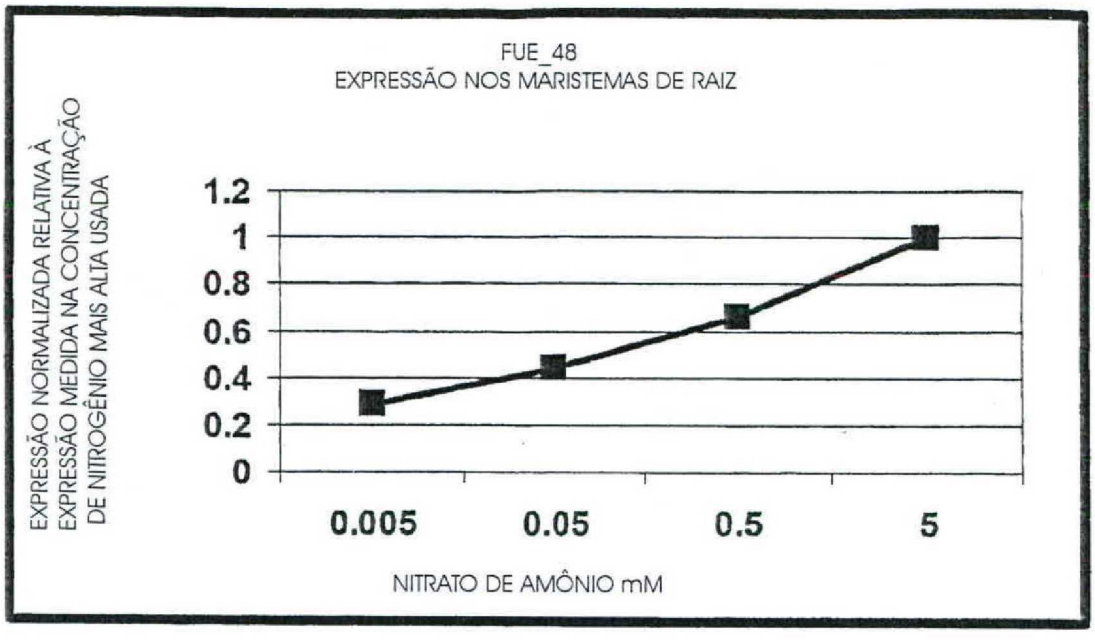

FUE_48
EXPRESSÃO NOS MARISTEMAS DE RAIZ
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.4I

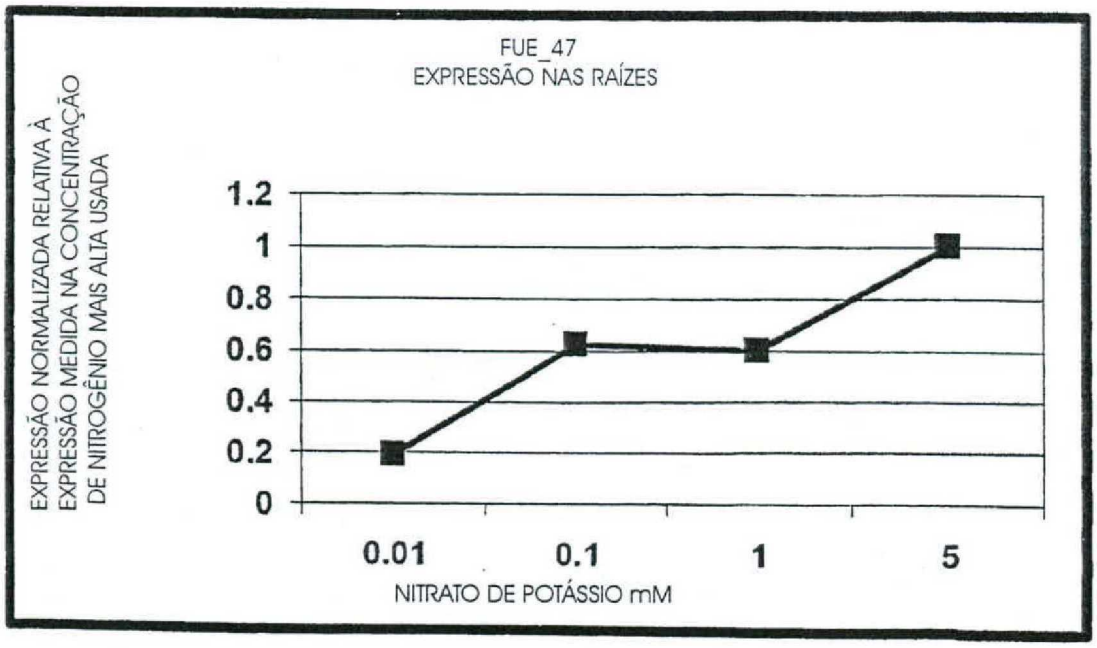

FUE_47
EXPRESSÃO NAS RAÍZES
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
0.1
1
5
NITRATO DE POTÁSSIO mM

FIG.4J

202

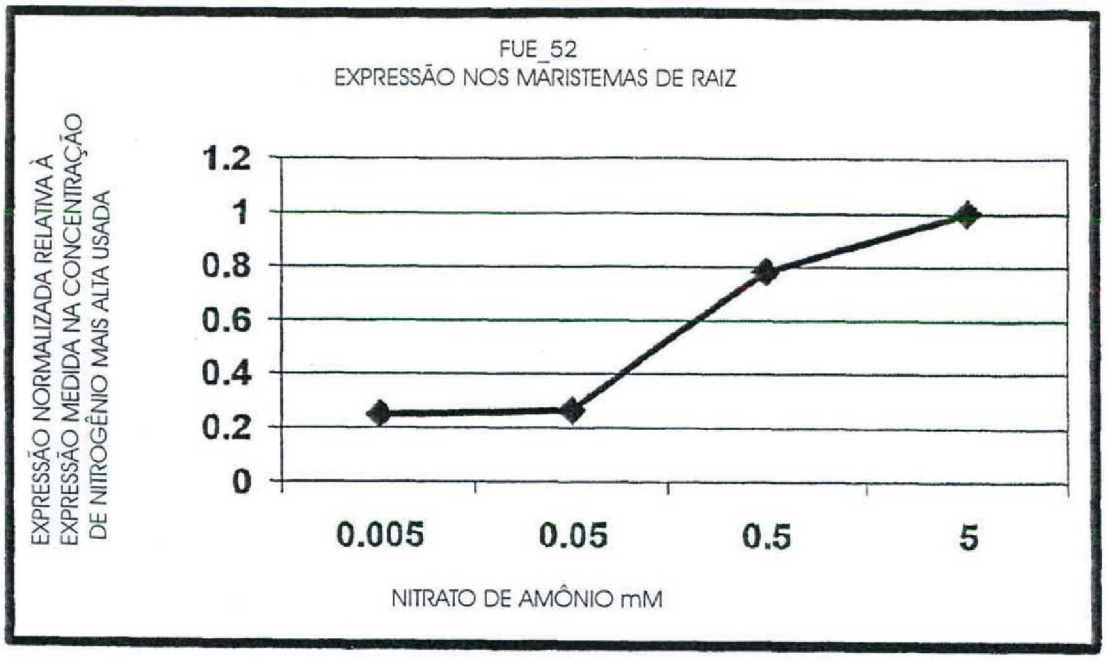


FIG.4K

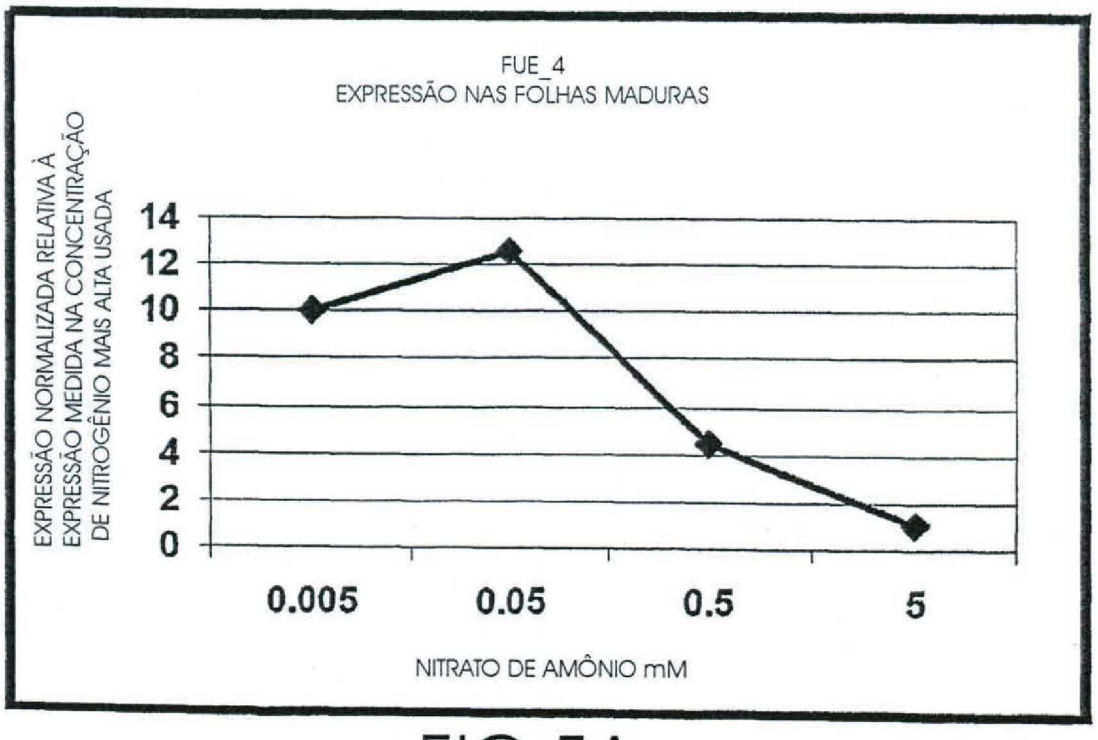


FIG.5A

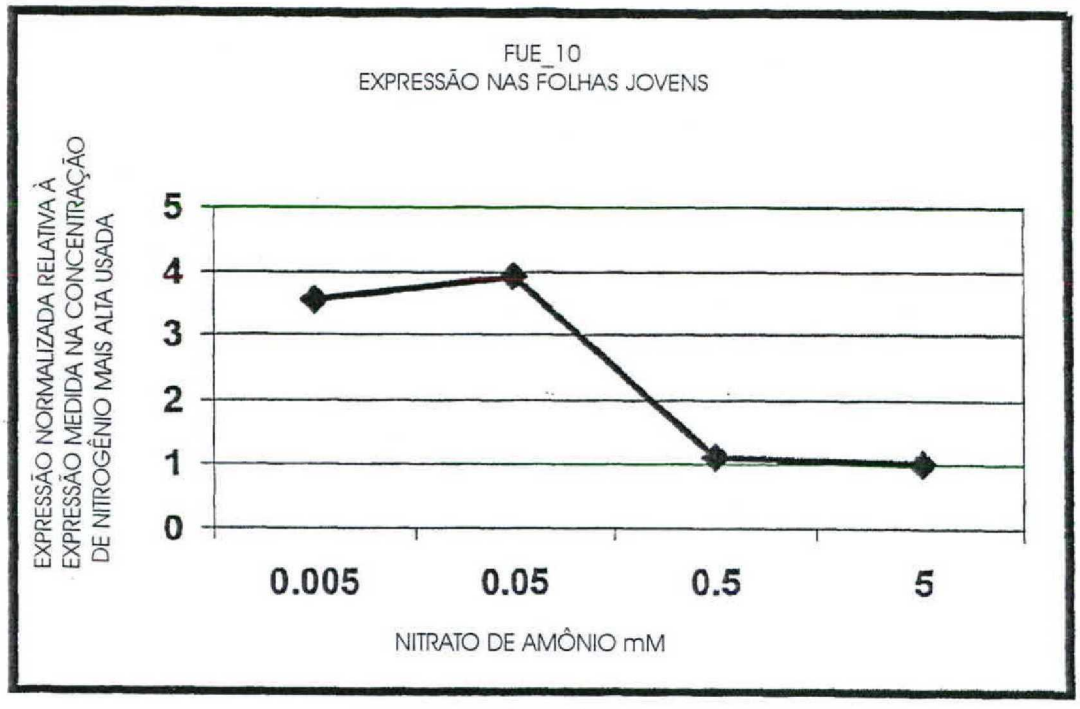

FUE_10
EXPRESSÃO NAS FOLHAS JOVENS
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
5
4
3
2
1
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.5B

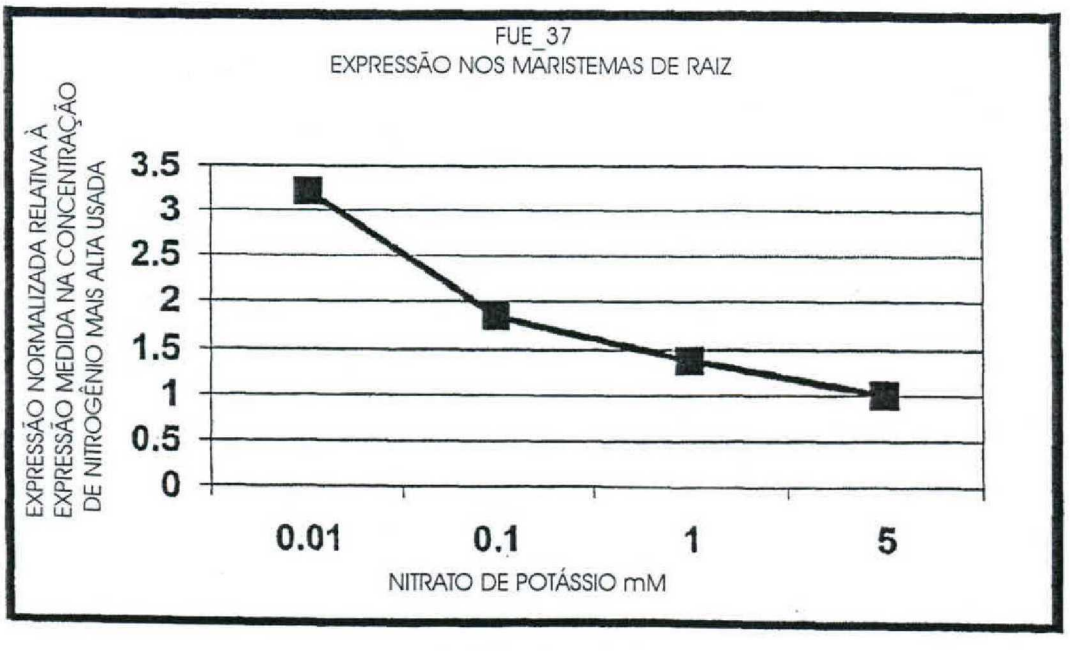

FUE_37
EXPRESSÃO NOS MARISTEMAS DE RAIZ
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.01
0.1
1
5
NITRATO DE POTÁSSIO mM

FIG.5C

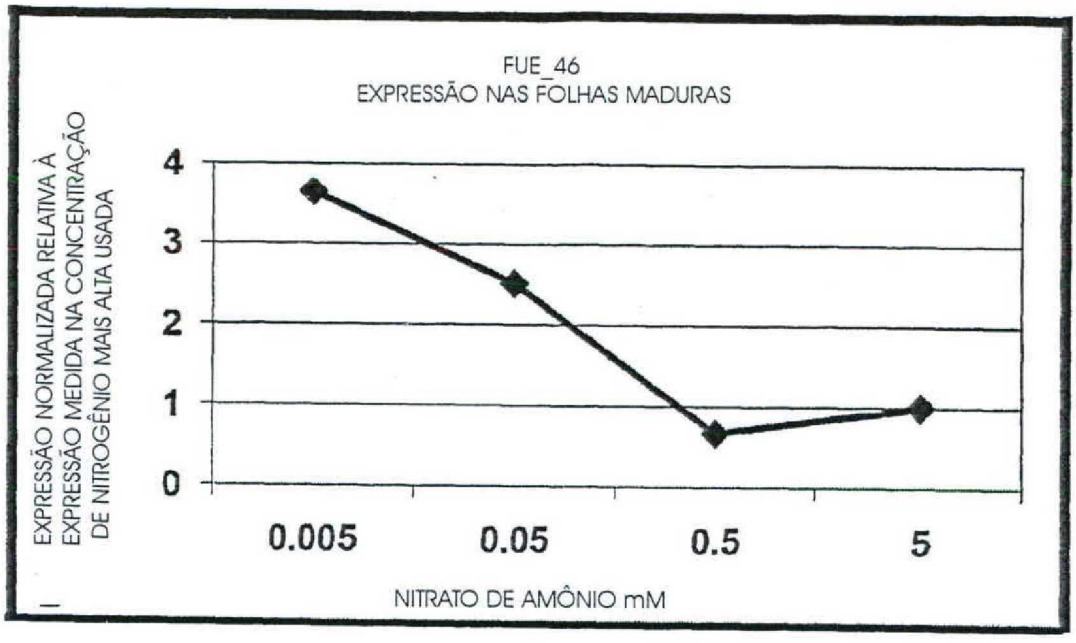

FUE_46
EXPRESSÃO NAS FOLHAS MADURAS
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
4
3
2
1
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.5D

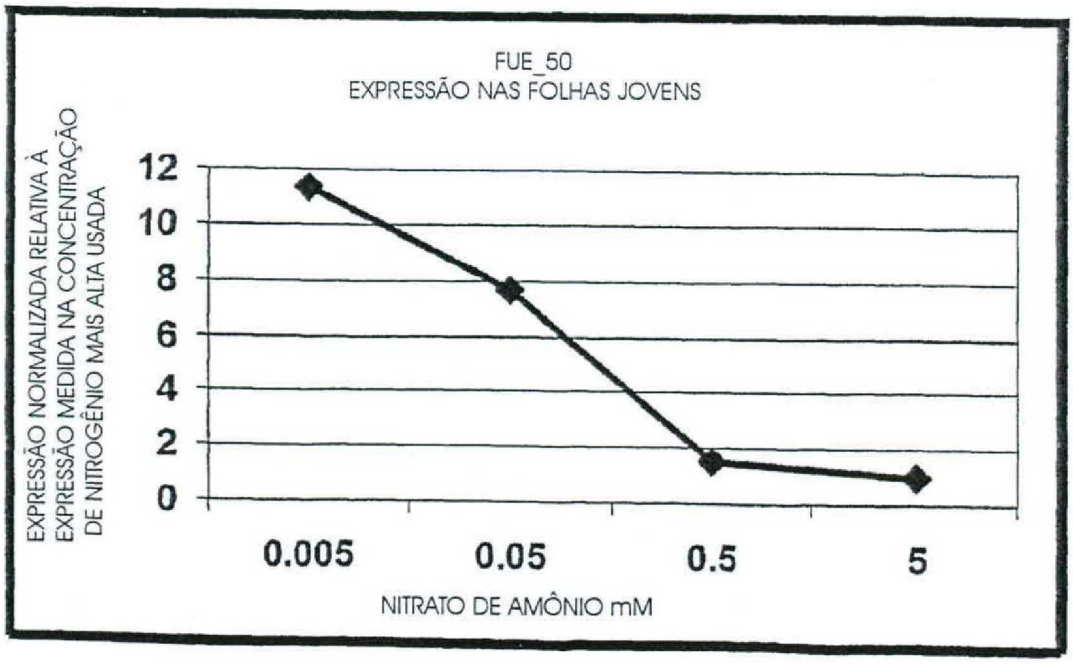

FUE_50
EXPRESSÃO NAS FOLHAS JOVENS
EXPRESSÃO NORMALIZADA RELATIVA À EXPRESSÃO MEDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO MAIS ALTA USADA
12
10
8
6
4
2
0
0.005
0.05
0.5
5
NITRATO DE AMÔNIO mM

FIG.5E

205

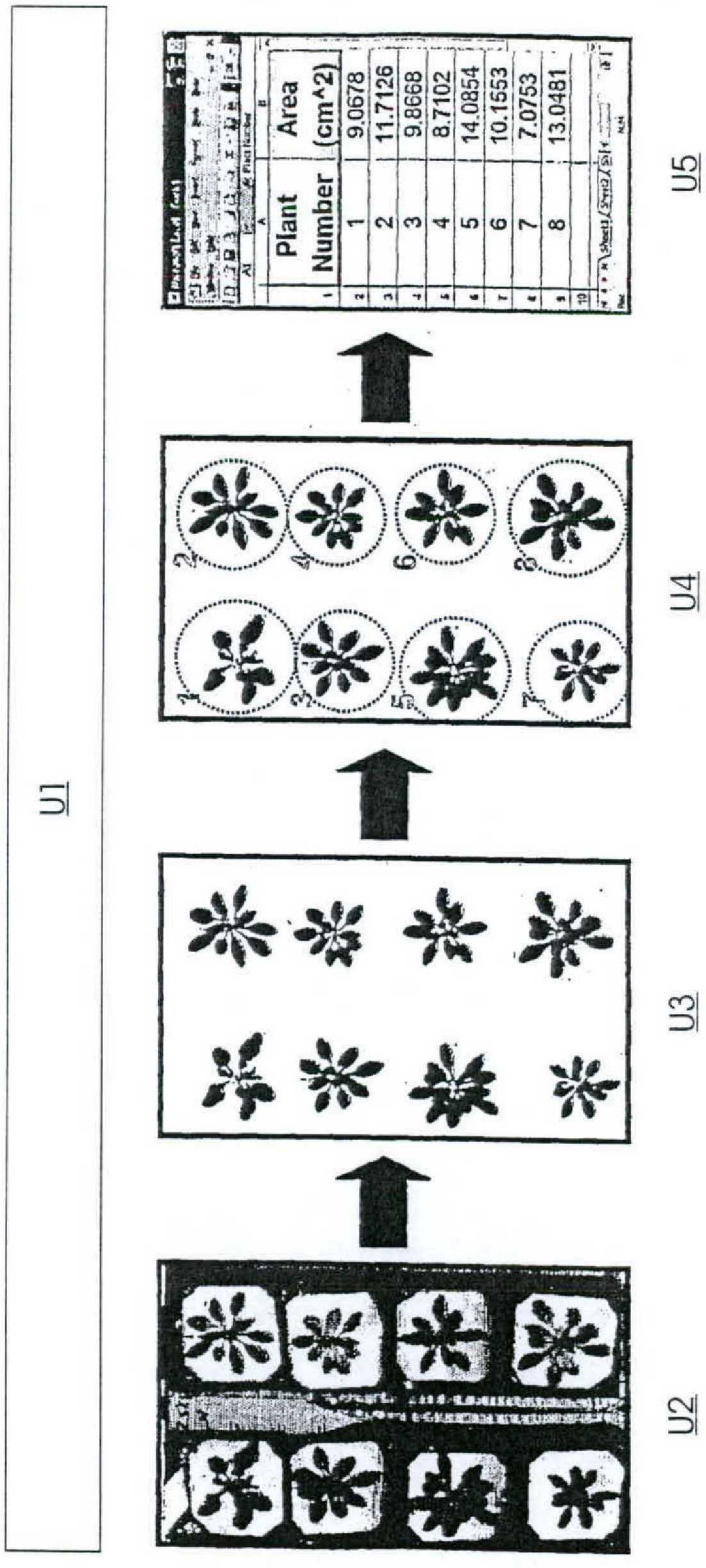

U1
U2
U3
U4
U5
Plant Number
Area (cm^2)
1 9.0678
2 11.7126
3 9.8668
4 8.7102
5 14.0854
6 10.1553
7 7.0753
8 13.0481

FIG.6

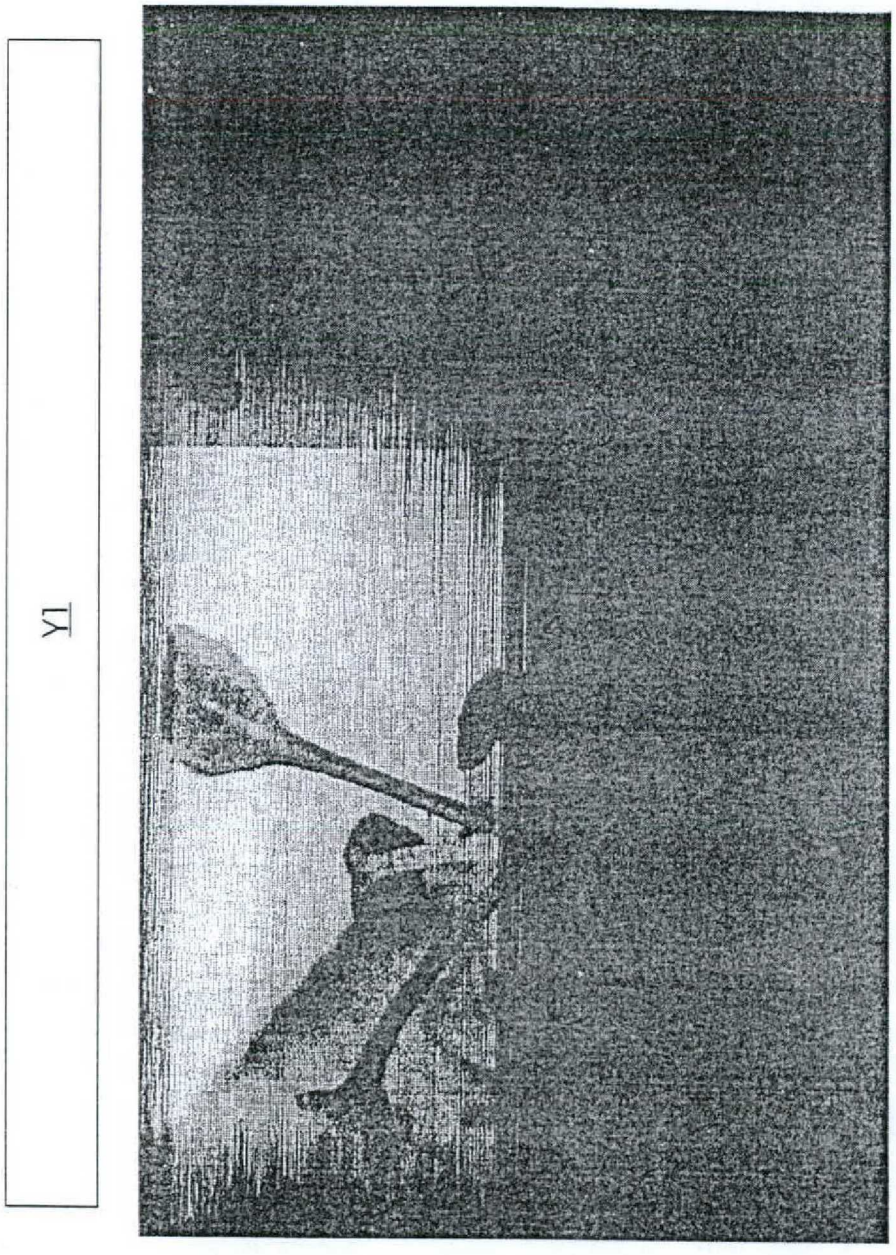


FIG.8

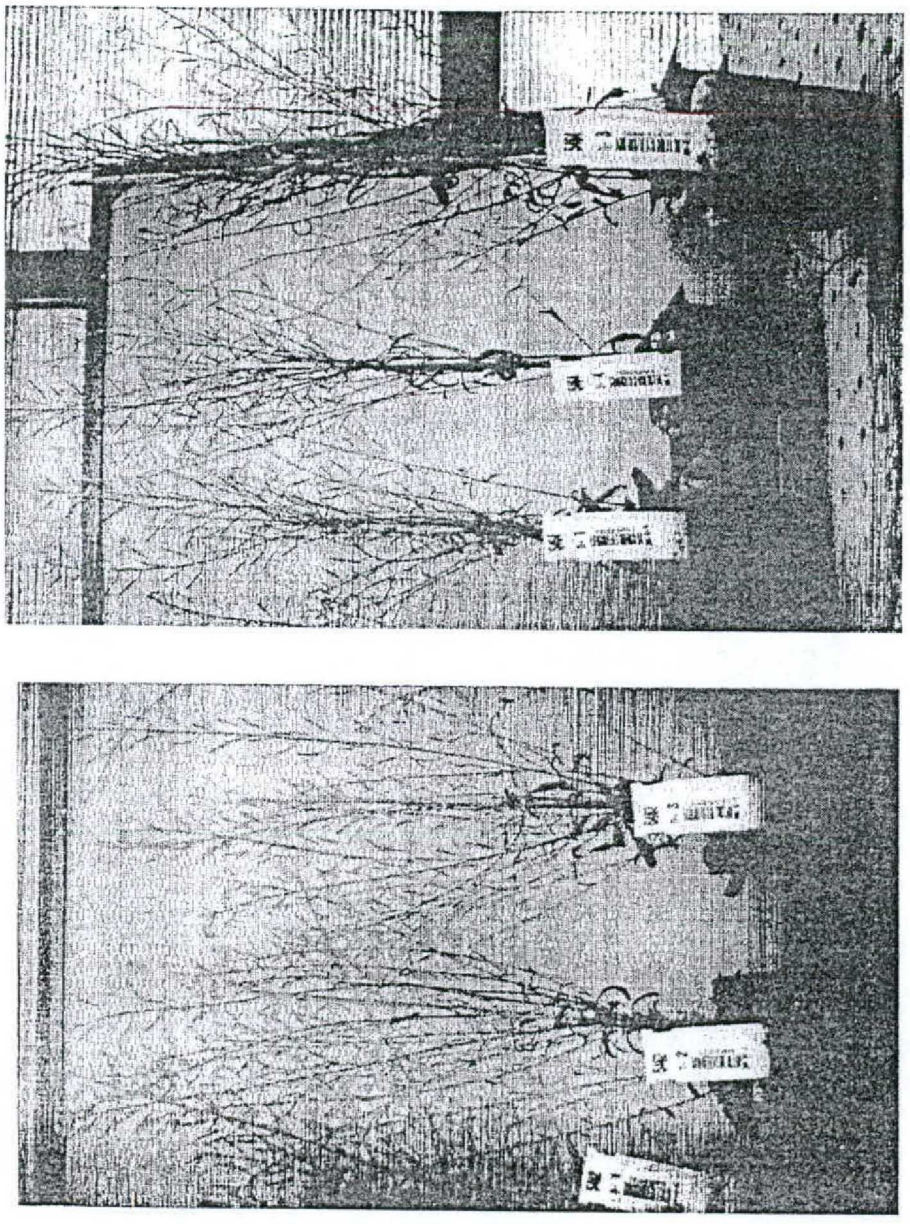


FIG.9

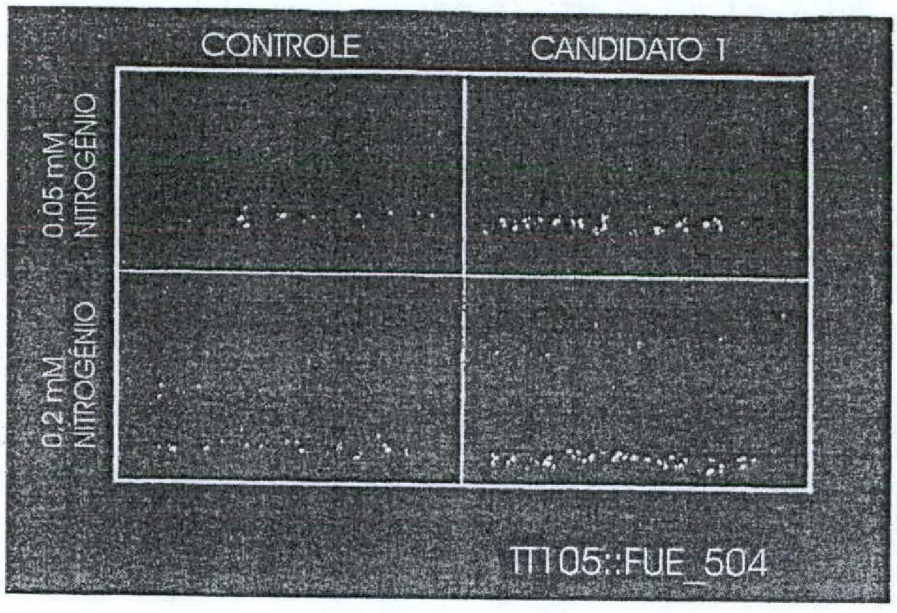

CONTROLE
CANDIDATO 1
0,05 mM NITROGÉNIO
0,2 mM NITROGÉNIO
TT105::FUE_504

FIG.7A

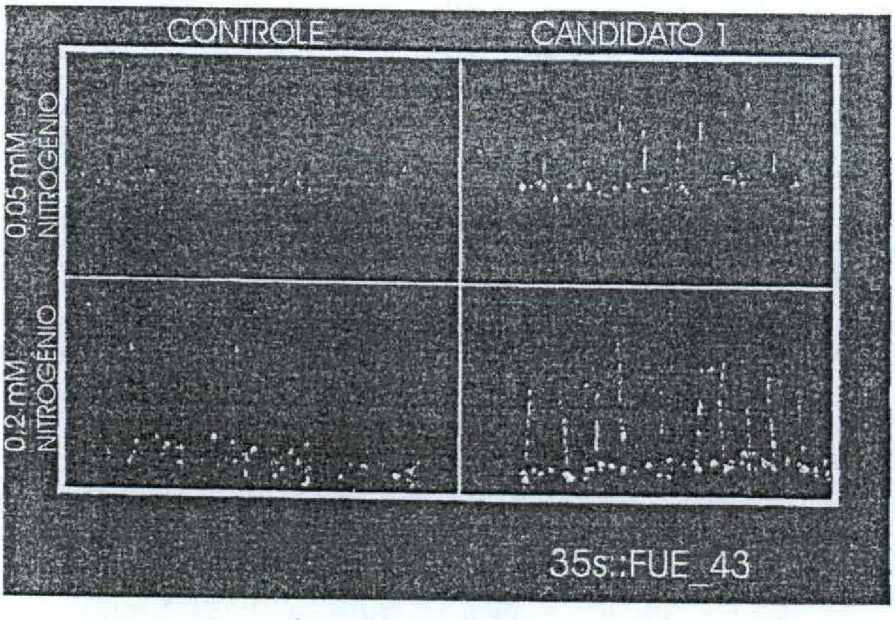

CONTROLE
CANDIDATO 1
0,05 mM NITROGÉNIO
0,2 mM NITROGÉNIO
35s::FUE_43

FIG.7B

209

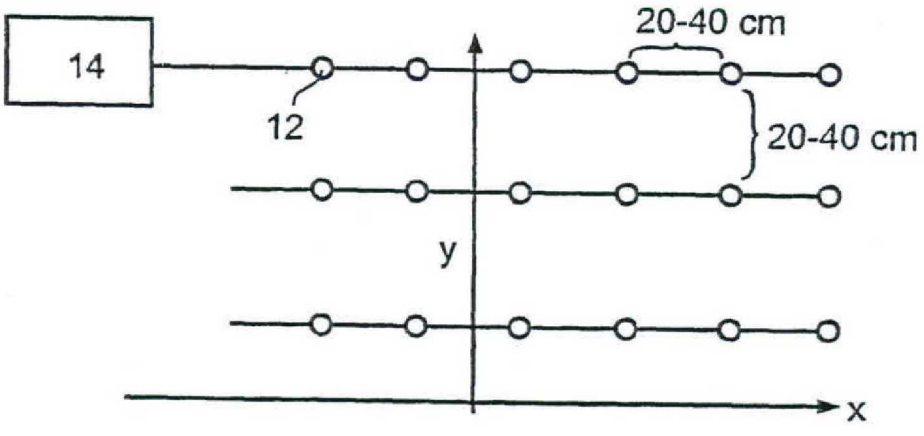


FIG.10