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

(11) PI 0719602-4 B1

(22) Data do Depósito: 20/12/2007

(45) Data de Concessão: 18/05/2021

(54) Título: CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS, E, MÉTODOS PARA APRIMORAR O COMPRIMENTO DE FIBRA DE UMA PLANTA QUE PRODUZ FIBRA E PARA PRODUZIR FIBRAS DE ALGODÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; A01H 1/00; C07H 21/04.

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2006 US 60/875,804.

(73) Titular(es): EVOGENE LTD..

(72) Inventor(es): SHARON AYAL; HAGAI KARCHI; LAURA BEKERMAN; EVGENIA GOLD.

(86) Pedido PCT: PCT IL2007001590 de 20/12/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/075364 de 26/06/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/06/2009

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, CONSTRUÇÃO DE UM ÁCIDO NUCLÊICO, CÉLULA TRANSGÊNICA, PLANTA TRANSGÊNICA, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA BIOMASSA DE UMA PLANTA, MÉTODO PARA AUMENTAR O VIGOR DE UMA PLANTA, MÉTODO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DE UMA PLANTA, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA AO STRESS ABIÓTICO, MÉTODO PARA APRIMORAR A QUALIDADE DA FIBRA E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA QUE PRODUZ FIBRA, MÉTODO PARA PRODUZIR FIBRAS DE ALGODÃO, SISTEMA DE CONSTRUÇÃO DE UM ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODO PARA EXPRESSAR UM POLIPEPTÍDEO DE INTERESSE EM UMA PLANTA, MÉTODO PARA EXPRESSAR UM POLIPEPTÍDEO DE INTERESSE EM UMA PLANTA DE ALGODÃO E CÉLULA, os polinucleotídeos isolados são fornecidos; cada um dos polinucleotídeos isolados compreende uma seqüência de ácido nucléico codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 80 % homóloga à SEQ ID N°s: 130-258 e 536-791, caracterizado pelo fato de que o polipeptídio é capaz de regular o desenvolvimento de fibra de algodão; são também fornecidos os métodos para usar tais polinucleotídeos para aprimorar qualidade da fibra e/ ou rendimento de uma planta que produz fibra, bem como métodos para usar tais polinucleotídeos para produzir plantas com biomassa/vigor/rendimento aumentados.

“CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS, E, MÉTODOS PARA APRIMORAR O COMPRIMENTO DE FIBRA DE UMA PLANTA QUE PRODUZ FIBRA E PARA PRODUZIR FIBRAS DE ALGODÃO”

CAMPO E HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A invenção, em algumas de suas realizações, refere-se aos polinucleotídeos e polipeptídios envolvidos no desenvolvimento de fibra de planta e métodos para usar os mesmos.

O algodão e subprodutos do algodão fornecem matérias-primas que são usadas para produzir uma fatura de produtos com base em consumidor, além de fibras têxteis incluindo gêneros alimentícios do algodão, alimentação de criações, fertilizante e papel. A produção, comercialização, consumo e negócio de produtos com base em algodão geram um excesso de $100 bilhões anualmente somente nos Estados Unidos, tornando o algodão como a safra com

Segue página 2/123

valor agregado número um. Apesar do crescimento de fibras sintéticas nos últimos 50 anos, o algodão ainda contabiliza aproximadamente 50 % da fibra têxtil mundial. Embora 90 % do valor do algodão como uma safra reside na fibra (fio de linho), o rendimento e a qualidade da fibra diminuíram, especialmente na última década. Esse declínio foi atribuído à erosão geral na diversidade genética das variedades do algodão, e uma vulnerabilidade aumentada da safra para condições ambientais.

As fibras de algodão podem ser obtidas de muitas variedades de algodão com uma variação de características para diversas aplicações. As fibras de algodão podem ser caracterizadas de acordo com uma variedade de propriedades, algumas das quais são consideradas altamente desejáveis dentro da indústria têxtil para a produção de produtos de alta qualidade de forma crescente e exploração ideal das tecnologias modernas de fiação. As propriedades comercialmente desejáveis incluem o comprimento, uniformidade do comprimento, fineza, proporção de maturidade, produção diminuída de fibra de partículas finas, micronaire, resistência do fardo e resistência de única fibra. Muito esforço foi feito para o aprimoramento das características das fibras de algodão principalmente enfocando no comprimento de fibra e fineza de fibra. Especificamente, existe uma grande demanda para as fibras de algodão de comprimentos específicos.

Diversas abordagens podem ser usadas para aprimorar as características ou rendimento das

fibras de algodão. O aprimoramento de variedade das plantas cultivadas de algodão foi realizado por criação cruzada. Entretanto, a criação é relativamente lenta e ineficiente, e o grau de variabilidade que pode ser atingindo é limitado à diversidade genética existente. Além disso, as plantas podem ser tratadas com hormônios, tais como, auxina, giberelina, citocinina, etileno ou brassinolida [vide, p.ex., Patente Norte-Americana N° 5880110]. Entretanto, nenhum efeito mensurável dos hormônios foi documentado, tornando o uso prático desses hormônios em larga escala altamente improvável. Alternativamente, o aprimoramento de variedade pode ser atingido por engenharia genética. Nos anos recentes, um processo notável foi feito na engenharia genética de planta com o aprimoramento bem-sucedido de variedade das plantas de safra comercialmente importantes, tais como algodão, soja, milho e canola. A ampla aceitação do algodão com engenharia genética, nos países produtores líderes, o torna um candidato atraente para a engenharia genética para aprimoramento do rendimento e/ou qualidade de fibra. Por exemplo, a introdução de uma codificação de gene para uma toxina de proteína de inseticida produziu Bacillus thuringiensis (BT) em uma planta de algodão possuindo resistência aprimorada a inseto. Além disso, as plantas de algodão com resistência aprimorada de herbicida (Glifosato) passaram por engenharia genética pela introdução de uma codificação de gene para sintetase de ácido 5-enol-piruvil-chiquímico 3-fosfato.

Uma fibra de algodão é

composta de uma única célula que se diferenciou de uma célula epidérmica do revestimento de semente, desenvolvendo=se por meio de quatro etapas cronológicas, i.e., iniciação, alongamento, espessamento da parede celular secundária e etapas de maturação. O alongamento de uma fibra de algodão tem início na célula epidérmica do óvulo imediatamente após a floração, após a qual a fibra de algodão rapidamente alonga-se por aproximadamente 21 dias. O alongamento de fibra é então terminado, e uma parede celular secundária é formada e cresce por meio de maturação para tornar-se uma fibra de algodão madura.

Pouco é conhecido sobre o controle genético da iniciação e alongamento da fibra de algodão. Já que ambas as fibras de algodão e tricomas Arabidopsis são desenvolvidas a partir de únicas células epidérmicas, foi sugerido que ambas compartilham regulação genética semelhante (Revisado em Wagner G.J. et. al. 2004). Em Arabidopsis, um grande número de estudos revelou as informações extensas sobre os mecanismos genéticos regulando a iniciação e alongamento do tricoma. Diversos estudos demonstraram as similaridades entre o tricoma e a fibra ao demonstrar que os promotores específicos da fibra de algodão conferem a expressão específica do tricoma em arabidopsis e plantas de tabaco (Kim e Triplett, 2001; Hsu et. al. 1999; Liu et. al. 2000, Wang et al. 2004). A maioria das pesquisas que estudam o desenvolvimento de fibra utiliza o tricoma arabidopsis como um sistema modelo para identificar os genes de algodão de uma forma em pequena escala (Kim e Triplett,

2001; Wang et al. 2004).

Diversos genes candidatos associados ao alongamento e formação das fibras de algodão foram identificados. Por exemplo, cinco genes de plantas de algodão que são especificamente expressos na etapa de alongamento da fibra de algodão foram identificados por triagem diferencial e métodos de exibição [Patente Norte-Americana N° 5.880.100 e Patentes Norte-Americanas N°s 5.932.713, 6.225.536 e 6.166.294].

WO0245485 descreve os métodos e meios para modular a qualidade da fibra nas plantas que produzem fibra, tal como algodão, ao modular a atividade e/ou expressão da sintase de sacarose (um açúcar importante para a síntese de parede celular) em tais plantas.

A Patente Norte-Americana N° 6.472.588 e WO0117333 fornecem os métodos para aumentar a qualidade da fibra de algodão (p.ex., resistência, comprimento, proporção de maturidade de fibra, conteúdo de fibra imatura, uniformidade de fibra ou micronaire) ao transformar uma planta de algodão com um DNA codificando a sintase de fosfato de sacarose.

WO9508914 revela uma planta que produz fibra compreendendo em seu genoma uma construção genética heteróloga que inclui um promotor específico de fibra e uma seqüência de codificação codificando uma peroxidase de planta, tal como uma peroxidase de algodão.

WO9626639 fornece um método utilizando uma seqüência de promotor específico de ovário

para expressar o crescimento de planta modificando os hormônios no tecido de óvulo do algodão. O método permite a modificação das características do conjunto de cápsula nas plantas de algodão e fornece um mecanismo para alterar as características de qualidade da fibra, tal como, dimensão e resistência de fibra.

A Patente Norte-Americana N° 5.981.834, Patente Norte-Americana N° 5.597.718, Patente Norte-Americana N° 5.620.882, Patente Norte-Americana N° 5.521.708 e Patente Norte-Americana N° 5.495.070 revelam um método de engenharia genética de uma planta que produz fibra e a identificação dos clones de cDNA úteis para identificar os genes de fibra no algodão.

Os pedidos de patente norte-americanos 2002049999 e 2003074697 revelam as plantas de algodão do gênero Gossypium expressando endoxiloglucan transferase, catalase ou peroxidase com características aprimoradas de fibra de algodão.

WO 01/40250 fornece um método para aprimorar a qualidade da fibra de algodão ao modular a expressão do gene de fator de transcrição.

WO 96/40924 fornece novas construções de DNA que podem ser usadas como sondas moleculares ou alternativamente inseridas em um hospedeiro de planta para modificar a transcrição de uma seqüência de interesse de DNA durante diversas etapas do desenvolvimento de fibra de algodão.

EP0834566 revela um gene que

controla o mecanismo de formação de fibra em uma planta de algodão.

A validação dos genes que aprimora o rendimento e qualidade de fibra de algodão in vivo exige que um sistema de modelo confiável para o desenvolvimento de fibra de algodão. Os modelos em outras plataformas de planta, tal como, células de tricoma e radicelas, são amplamente aceitos para o desenvolvimento de fibra de algodão. Entretanto, as alterações de medição na taxa de crescimento, comprimento e espessura de célula não são fáceis, devido ao pequeno tamanho, difícil acesso e falta de uniformidade nos tamanhos. Os presentes inventores analisaram os pêlos de semente de tomate para seu possível uso como um tecido modelo para o desenvolvimento de fibra de algodão (WO2005/121364 que é aqui incorporada por referência) e demonstraram uma alta correlação entre o pêlo de semente de tomate e a fibra de algodão.

A geração das plantas transgênicas estavelmente transformadas para avaliar a função do gene é um processo manipulativo prolongado. Como uma alternativa, a expressão do gene estrangeiro nas plantas é freqüentemente realizada usando a transformação transitória das células ou tecidos. A expressão de gene transitório mediada por Agrobacterium (agroinfiltração) nas folhas de planta tornou-se a escolha favorita em muitas análises funcionais de gene (Kapila et al., 1997; Yang et al., 2000; Goodin et al., 2002). Existem protocolos vigentes para a expressão de gene transitório nas fibras de algodão

de crescimento de cultura de tecido [tal como, Kim HJ, et al., 2001]. Orzaez D., et al. 2006, desenvolveu um sistema com base em agroinfiltração (agroinjeção), que permite a expressão transitória dos gene estrangeiros diretamente nos tecidos de fruta do tomate.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de ácido nucléico codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 80 % homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791, caracterizado pelo fato de que o polipeptídio é capaz de regular o desenvolvimento de fibra.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um polipeptídio isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 80 % homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791, caracterizado pelo fato de que o polipeptídio é capaz de regular o desenvolvimento de fibra.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de ácido

nucléico pelo menos 95 % idêntica à SEQ ID N°: 851, 848, 857 ou 854, caracterizado pelo fato de que a seqüência de ácido nucléico é capaz de regular uma expressão de uma seqüência heteróloga de polinucleotídeo operativamente ligada à mesma.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecida uma construção de ácido nucléico compreendendo o polinucleotídeo isolado.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecida uma construção de ácido nucléico compreendendo o polinucleotídeo isolado e uma seqüência heteróloga de ácido nucléico, operativamente anexada à mesma.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecida uma célula transgênica compreendendo o polinucleotídeo isolado.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido uma célula transgênica, expressando exogenamente, o polipeptídio isolado.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecida uma planta transgênica compreendendo o polinucleotídeo isolado.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido uma planta transgênica expressando exogenamente o polipeptídio isolado.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar a biomassa de uma planta, o método compreendendo a

expressão exógena do polipeptídio isolado na planta, assim aumentando a biomassa da planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar um vigor de uma planta, o método compreendendo a expressão exógena do polipeptídio isolado na planta, assim aumentando o vigor da planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar um rendimento de uma planta, o método compreendendo uma expressão exógena do polipeptídio isolado na planta, assim aumentando o rendimento da planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar uma tolerância de uma planta ao stress abiótico, o método compreendendo uma expressão exógena do polipeptídio isolado na planta, assim aumentando a tolerância da planta ao stress abiótico.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aprimorar a qualidade da fibra e/ou rendimento de uma planta que produz fibra, o método compreendendo uma expressão exógena do polipeptídio isolado na planta que produz fibra, assim aprimorando a qualidade e/ou rendimento da planta que produz fibra.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar uma biomassa de uma planta, o método compreendendo

a expressão da construção de ácido nucléico na planta, assim aumentando a biomassa da planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar um vigor de uma planta, o método compreendendo a expressão da construção de ácido nucléico na planta, assim aumentando o vigor da planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para aumentar um rendimento de uma planta, o método compreendendo a expressão da construção de ácido nucléico na planta, assim aumentando o rendimento da planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para produzir fibras de algodão, o método compreendendo: (a) gerar uma planta transgênica de algodão expressando exogenamente o polipeptídio isolado; e (b) colher as fibras da planta transgênica de algodão, assim produzindo as fibras de algodão.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecida uma construção de ácido nucléico compreendendo: (i) uma primeira seqüência de polinucleotídeo que compreende um gene repórter operativamente ligado a um promotor específico de fibra; e (ii) uma segunda seqüência de polinucleotídeo que compreende uma seqüência heteróloga de ácido nucléico codificando um polipeptídio de interesse operativamente ligado a um promotor.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um sistema da construção de ácido nucléico compreendendo: (i) uma primeira construção de ácido nucléico que compreende uma primeira seqüência de polinucleotídeo compreendendo um gene repórter operativamente ligado a um promotor específico de fibra; e (ii) uma segunda construção de ácido nucléico que compreende uma segunda seqüência de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência heteróloga de ácido nucléico codificando um polipeptídio de interesse operativamente ligado a um promotor.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para expressar um polipeptídio de interesse em uma planta, compreendendo a administração à planta da construção de ácido nucléico ou sistema da construção de ácido nucléico, assim expressando o polipeptídio de interesse na planta.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecido um método para expressar um polipeptídio de interesse em uma planta de algodão, compreendendo a injeção em uma bola de algodão da planta de algodão de uma construção de ácido nucléico que compreende uma seqüência de ácido nucléico codificando o polipeptídio de interesse, assim expressando o polipeptídio de interesse na planta de algodão.

De acordo com um aspecto de algumas realizações da invenção, é fornecida uma célula compreendendo a construção de ácido nucléico ou o sistema da

construção de ácido nucléico.

De acordo com algumas realizações da invenção, a seqüência de ácido nucléico é selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 1, 12, 2, 17, 10, 11, 8, 4, 7, 6, 5, 3, 9, 13, 14, 15, 16, 18-129 e 259-535.

De acordo com algumas realizações da invenção, o polipeptídio é selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791.

De acordo com algumas realizações da invenção, o polinucleotídeo isolado é conforme estabelecido pela SEQ ID N°: 851, 848, 857 ou 854.

De acordo com algumas realizações da invenção, a seqüência de ácido nucléico é mais curta do que 1800 bp.

De acordo com algumas realizações da invenção, a fibra compreende uma fibra de algodão.

De acordo com algumas realizações da invenção, a construção de ácido nucléico ainda compreende pelo menos um elemento regulatório atuante cis operativamente ligado ao polinucleotídeo isolado.

De acordo com algumas realizações da invenção, a expressão é efetuada em uma ponta de raiz da planta.

De acordo com algumas

realizações da invenção, a qualidade da planta que produz fibra compreende pelo menos um parâmetro selecionado a partir do grupo consistindo em comprimento de fibra, resistência de fibra, peso de fibra por comprimento de unidade, proporção de maturidade, uniformidade e micronaire.

De acordo com algumas realizações da invenção, a planta que produz fibra é selecionada a partir do grupo consistindo em algodão, árvore de algodão de seda, salgueiro do deserto, arbusto de creosoto, winterfat (Krascheninnikovia lanata), balsa, ramie, kenaf (Hibiscus cannabinus), cânhamo, roselle (Hibiscus sabdariffa), juta, abacá de sisal e linho.

De acordo com algumas realizações da invenção, o desenvolvimento de fibra compreende a formação de fibra.

De acordo com algumas realizações da invenção, o desenvolvimento de fibra compreende o alongamento de fibra.

De acordo com algumas realizações da invenção, a planta é uma planta de algodão.

De acordo com algumas realizações da invenção, a administração é efetuada ao injetar a construção de ácido nucléico ou sistema da construção de ácido nucléico a uma bola de algodão da planta de algodão.

De acordo com algumas realizações da invenção, a construção de ácido nucléico é composta na agrobactéria.

De acordo com algumas realizações da invenção, a expressão é efetuada em uma célula de óvulo da planta de algodão.

De acordo com algumas realizações da invenção, o polipeptídio de interesse regula o desenvolvimento de fibra.

Exceto se de outro modo definido, todos os termos técnicos e/ou científicos aqui usados possuem os mesmos significados conforme comumente entendidos por aquele com habilidade ordinária na técnica a quem esta invenção pertencente. Embora os métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aqui descritos sejam usados na prática ou teste das realizações da invenção, os métodos e/ou materiais exemplares estão abaixo descritos. No caso de conflito, a especificação de patente, incluindo as definições, controlará. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não têm a intenção de serem necessariamente limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Algumas realizações da invenção são aqui descritas, somente como exemplo, com referência aos desenhos anexos. Com referência específica agora aos desenhos em detalhes, é enfatizado que os detalhes mostrados são como exemplo e para os fins de discussão ilustrativa das realizações da invenção. Com relação a isso, a descrição tomada com os desenhos torna aparente para aqueles com habilidade na técnica como as realizações da invenção podem ser praticadas.

Nos desenhos:

a figura 1 é uma ilustração esquemática do plasmídio binário pgi usado para expressar as seqüências de polinucleotídeo isolado da invenção sob o controle do promotor 35s. borda direita rb - t-dna; borda esquerda lb - t-dna; enzima de restrição h - hindlll; enzima de restrição x - xbal; b - enzima de restrição bamhl; enzima de restrição s - sall; enzima de restrição sm - smal; enzima de restrição r-i - ecori; sc - saci/sstl/ecl136ii; (números) - comprimento em pares de base; nos pro = promotor de sintase de nopalina; npt-ii = gene de fototransferase de neomicina; nos ter = terminador de sintase de nopalina; sinal poli-a (sinal de poliadenilação); gusintron - o gene repórter gus (seqüência de codificação e intron). as seqüências de polinucleotídeo isolado da invenção foram clonadas no vetor no momento da substituição do gene repórter gusintrão;

as figsuras 2a-d são gráficos em barra ilustrando o perfil de expressão dos genes selecionados de desenvolvimento de fibra em diversas etapas de desenvolvimento medidas em dias pós-ântese (dpa) e tecidos. a figura 2a - ct4 (seq id n°:842); figura 2b - ct74 (seq id n°:843); figura 2c - ct11 (seq id n°:844); figura 2d - ct9 (seq id n°:857). as etapas de desenvolvimento e tecidos

são conforme segue: (a) -2 dpa; (b) 0-1 dpa; (c) 2-3 dpa; (d) 4-5 dpa; (e) 6-8 dpa; (f) 9-11 dpa; (g) 12-14 dpa; (h) 15-17 dpa; (i) 18-20 dpa; (j) folhas jovens: (k) caules jovens; (1) raízes jovens; (m) folhas; (n) caules; (o) sépalas; (p) pétalas; (q) plantas de estame (g. hirsutum var. acala). as quantias relativas de mrna são apresentadas em todos os tecidos examinados. o eixo y representa o nível de expressão normalizado contra três diferentes genes domésticos;

as figuras 3a-f são fotomicrógrafos ilustrando a avaliação do promotor específico de fibra em arabidopsis. a expressão de gus nas folhas (figuras 3a-c) e raízes (figuras 3d-f) sob regulação do promotor 35s (seq id n°:841) (figuras 3a e d), promotor ct4 (seq id n°:848) (figuras 3b e e) e promotor ct74 (seq id n°:851) (figuras 3 c e f). observe que a alta intensidade de coloração (correspondente ao alto nível de expressão) de gus nas folhas de plantas arabidopsis sob os promotores ct4 (figura 3b) ou ct74 (figura 3c);

as figuras 4a-c são fotomicrógrafos ilustrando a detecção do promotor nas bolas de algodão usando uma realização específica do ensaio transitório aqui descrito, a agroinjeção de gus sob regulação dos promotores ct2 ou 35s. a figura 4a - ct2::gus em 3 dpa; figura 4b - 35s::gus em 3dpa; figura 4c -

35s::gus em 8 dpa;

as figuras 5a-c são fotomicrógrafos ilustrando a expressão em excesso de ct20 e expansina em cis ao gene repórter gfp por transfecção transitória das bolas de algodão nas fibras de desenvolvimento de 4 dpa. para controle, a agroinjeção de ct2::gfp foi usada; figura 5a - ct2::gfp (controle); figura 5b - ct2::gfp+35s::ct20 (por transfecção transitória do vetor binário ilustrado na figura 7); figura 5c - ct2::gfp+35s::expansina;

a figura 6 é uma ilustração esquemática ilustrando um vetor binário exemplar da invenção [designado como pgi(promotor ct2)+ct82(promotor 35s)], em que ct82 orf (seq id n°:890) está sob o controle de transcrição do promotor 35s constitutivo (seq id n°:841) e gusintron (seq id n°:872) está sob o controle de transcrição do promotor ct2 (seq id n°: 873). nos pro = promotor de sintase de nopalina; npt-ii = gene de fototransferase de neomicina; nos ter = terminador de sintase de nopalina; e

a figura 7 é uma ilustração esquemática ilustrando um vetor binário exemplar da invenção [designado como pct20+gfp (ct2prom)], em que a estrutura de leitura aberta de gfp (orf) (seq id n°:871) está sob o controle de transcrição do promotor ct2 (seq id n°:873) e orf ct20 (seq id n°:881) está

sob o controle de transcrição do promotor 35s constitutivo (seq id n°:841). -nos pro = promotor de sintase de nopalina; npt-ii = gene de fototransferase de neomicina; nos ter = terminador de sintase de nopalina.

DESCRIÇÃO DAS REALIZAÇÕES ESPECÍFICAS DA INVENÇÃO

A invenção, em algumas de suas realizações, refere-se aos polinucleotídeos e polipeptídios envolvidos no desenvolvimento de fibra de planta e métodos para usar os mesmos de modo a aprimorar a qualidade da fibra e/ou rendimento/biomassa/vigor de uma planta e, em uma realização exemplar, uma planta que produz fibra.

Antes de explicar pelo menos uma realização da invenção em detalhes, deve ser entendido que a invenção não é necessariamente limitada em sua aplicação aos detalhes estabelecidos na seguinte descrição ou exemplificada pelos Exemplos. A invenção é capaz de outras realizações ou de ser praticada ou realizada em diversos modos.

Enquanto reduz a invenção à prática, os presentes inventores identificaram polinucleotídeos e polipeptídios codificados para tanto que estão envolvidos no desenvolvimento de fibra e que podem ser usados para aumentar a qualidade da fibra e/ou rendimento e biomassa da planta.

Dessa forma, conforme descrito na seção de Exemplos que se segue, os presentes inventores projetaram uma nova abordagem computacional combinada com os

dados de perfil de expressão relacionados à fibra gerados usando o microarranjo de oligonucleotídeo de algodão e RT-PCR quantitativo para identificar os genes que têm um papel no desenvolvimento de fibra. Os genes que são expressos durante a iniciação e alongamento de fibra, nos tecidos alongados, tais como, pontas de raiz, xilema e/ou sob condições de descoramento, tal como, stress abiótico (p.ex., seca) foram identificados (Exemplo 1 da seção de Exemplos que se segue). Seu perfil de expressão foi determinado em uma variedade de plantas de algodão em diversas etapas de desenvolvimento de fibra (Exemplos 2, 3 e 4 da seção de Exemplo que se segue). Os genes em que o perfil de expressão correlacionou-se com o desenvolvimento de fibra foram selecionados (polinucleotídeos SEQ ID N°s:1-129; polipeptídios SEQ ID N°s:130-258; Tabela 7, Exemplo 4 da seção de Exemplos que se segue), bem como os polipeptídios homólogos (SEQ ID N°s:536-791) de outras espécies de planta (Tabela 8, Exemplo 4 da seção de Exemplos que se segue). Conforme é ainda descrito nos Exemplos 5, 6 e 7 da seção de Exemplos que se segue, a expressão exógena dos vetores de ácido nucléico binário abrigando os genes selecionados de desenvolvimento de fibra (p.ex., SEQ ID N°s:1-17, 22 e 37) sob o controle de transcrição de um promotor constitutivo (promotor 35S Vírus Mosaico de Couve-Flor) nas plantas de tomate resultou em um efeito geral sobre o comprimento do pêlo de semente de tomate. Além disso, as seqüências de promotor dos genes envolvidas no desenvolvimento de fibra foram isoladas (SEQ ID N°s:851, 848, 857 ou 854; o Exemplo 8

da seção de Exemplos que se segue), clonadas em vetores binários a montante de um gene relatado (GUS) (Exemplo 9 da seção de Exemplos) e expressas exogenamente nas plantas de tomate (Exemplo 10 da seção de Exemplos). Esses estudos de expressão demonstraram a identificação das seqüências de promotor que estão ativas durante a iniciação (promotor CT4; SEQ ID N°:848) ou alongamento (promotores CT9 e CT74; SEQ ID N°s: 857 e 851, respectivamente) do desenvolvimento de fibra (Exemplo 10 da seção de Exemplos). De modo geral, esses resultados demonstram que os polinucleotídeos isolados (p.ex., SEQ ID N°s: 1-129 e 259-535) e polipeptídios (p.ex., SEQ ID N°s: 130-258 e 536-791) da invenção, bem como os promotores isolados de desenvolvimento de fibra (p.ex., SEQ ID N°s:851, 848, 857 ou 854) podem ser usados para aprimorar a qualidade da fibra e/ou rendimento de uma planta que produz fibra e aumentar a biomassa/vigor/rendimento bem como a resistência ou tolerância ao stress abiótico das plantas de modo geral.

Dessa forma, de acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de ácido nucléico codificando um polipeptídio com uma seqüência de aminoácido pelo menos 80 % homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791, caracterizado pelo fato de que o polipeptídio é capaz de regular o desenvolvimento de fibra.

Conforme aqui usado, a frase

"planta que produz fibra" refere-se às plantas que compartilham a característica comum de ter um formato alongado e celulose abundante nas paredes celulares espessas, tipicamente denominadas como paredes secundárias. Tais paredes podem ou não ser lignificadas, e o protoplasto de tais células pode ou não ser viável na maturidade. Tais fibras possuem muitos usos industriais, por exemplo, em produtos de madeira fabricados e madeira serrada, papel, fibras têxteis, material para saco e caixa, cordame, escovas e vassouras, enchimento e estofamento, calafetagem, reforço de outros materiais e fabricação de derivativos de celulose.

O termo "fibra" é normalmente inclusivo de células de condução com parede espessa, tais como, vasos e traqueídos e agregados fibrilares de muitas células de fibra individuais. Portanto, o termo "fibra" refere-se a (a) células de condução e não condução com parede espessa do xilema; (b) fibras de origem extraxilar, incluindo aquelas de floema, casca, tecido de solo e epiderme; e (c) fibras de caules, folhas, raízes, sementes e flores ou inflorescência (tal como, aqueles de Sorgo vulgare usados na fabricação de escovas e vassouras).

O Exemplo de planta que produz fibras, inclui, porém sem limitação, safras agrícolas, tais como, algodão, árvore de algodão de seda (Kapok, Ceiba pentandra), salgueiro do deserto, arbusto de creosoto, winterfat (Krascheninnikovia lanata), balsa, kenaf (Hibiscus cannabinus), roselle (Hibiscus sabdariffa), juta, abacá de sisal, linho, milho, cana de açúcar, cânhamo, ramie, kapok,

fibra de coco, bambu, Musgo espanhol e Agave spp. (p.ex., sisal).

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, a planta que produz fibra é o algodão.

Conforme aqui usado, o termo "algodão" refere-se a um tipo selvagem, uma variedade cultivada (p.ex., híbrida) ou uma planta de algodão transgênico (Gossypium).

A frase "desenvolvimento de fibra de algodão" refere-se ao desenvolvimento do pêlo da semente de algodão.

Conforme aqui usado, o termo "desenvolvimento" quando usado no contexto de fibras (p.ex., fibras de algodão) refere-se à iniciação da fibra (formação da fibra) e/ou seu alongamento, bem como o engrossamento e maturação da parede celular secundária da fibra.

Dessa forma, a invenção abrange os polinucleotídeos identificados usando a presente metodologia e seu polipeptídio codificado, bem como os polinucleotídeos codificando equivalentes funcionais dos polipeptídios aqui identificados (i.e., polipeptídios que são capazes de regular o desenvolvimento de fibra, conforme pode ser determinado de acordo com os ensaios descritos na seção de Exemplos que se segue). Tais equivalentes funcionais podem ser 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 94 %, pelo menos cerca de 95 %, p.ex., 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % homólogos a uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791.

A homologia de uma seqüência de aminoácido (p.ex., homologia de porcentagem) pode ser determinada usando qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, software BlastP do Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (NCBI) tal como ao usar parâmetros default.

Os polinucleotídeos codificando os equivalentes funcionais podem ser 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 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 %, p.ex., 100 % idênticos ou

homólogos a uma seqüência de ácido nucléico selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°: 1, 12, 2, 17, 10, 11, 8, 4, 7, 6, 5, 3, 9, 13,14, 15, 16, 18-129 e 259-535.

A identidade de uma seqüência de ácido nucléico (p.ex., homologia de porcentagem) pode ser determinada usando qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, software BlastN do Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (NCBI) tal como ao usar parâmetros default.

Conforme aqui usado, a frase "um polinucleotídeo isolado" refere-se a uma única ou duplas seqüências trançadas de ácido nucléico que são isoladas e fornecidas na forma de uma seqüência de RNA, uma seqüência complementar de polinucleotídeo (cDNA), uma seqüência de polinucleotídeo genômico e/ou uma seqüência de polinucleotídeo composto (p.ex., uma combinação do acima).

Conforme aqui usado, a frase "seqüência complementar de polinucleotídeo" 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 usado, a frase "seqüência de polinucleotídeo genômico" refere-se a uma seqüência derivada (isolada) a partir de um cromossomo e assim representa uma porção contígua de um cromossomo.

Conforme aqui usado, a frase

"seqüência composta de polinucleotídeo" refere-se a uma seqüência, que é pelo menos de forma parcial e complementar e pelo menos parcialmente genômica. Uma seqüência composta pode incluir algumas seqüências de exon exigidas para codificar o polipeptídio da invenção, bem como algumas seqüências de intron interpostas entre elas. As seqüências de intron podem ser de qualquer fonte, incluindo de outros genes, e tipicamente incluirão as seqüências de sinal de entrançamento conservado. Tais seqüências de intron podem ainda incluir os elementos regulatórios de expressão atuante de cis.

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, a seqüência de ácido nucléico é conforme estabelecida na SEQ ID N°: 1, 12, 2, 17, 10, 11, 8, 4, 7, 6, 5, 3, 9, 13, 14, 15, 16, 18-129, 259-534 ou 535.

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, o polinucleotídeo isolado é conforme estabelecido na SEQ ID N°: 1, 12, 2, 17, 10, 11, 8, 4, 7, 6, 5, 3, 9, 13, 14, 15, 16, 18-129, 259-534 ou 535.

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, a seqüência de aminoácido é conforme estabelecida na SEQ ID N°: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258, 536-790 ou 791.

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, o polipeptídio é conforme estabelecido na SEQ ID N°: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-

258, 536-790 ou 791.

Os polinucleotídeos isolados deste aspecto da invenção também podem ser qualificados usando um ensaio de hibridização ao incubar os polinucleotídeos isolados abaixo descritos na presença de uma sonda de oligonucleotídeo ou primer sob condições de hibridização de moderadas a rigorosas.

As condições de hibridização de moderadas a rigorosas são caracterizadas por uma solução de hibridização, tal como, contendo 10 % de sulfato de dextrano, 1 M de NaCl, 1 % de SDS e $5x10^6$ cpm ^{32}P sonda rotulada, em 65 °C, com uma solução final de lavagem de 0,2 x SSC e 0,1 % de SDS e lavagem final em 65 °C e considerando que a hibridização moderada é efetuada usando uma solução de hibridização contendo 10 % de sulfato de dextrano, 1 M de NaCl, 1 % de SDS e 5 x 10^6 cpm ^{32}P sonda rotulada, em 65 °C, com uma solução final de lavagem de 1 x SSC e 0,1 % de SDS e lavagem final em 50 °C.

As seqüências de ácido nucléico codificando os polipeptídios da invenção podem ser otimizadas para a expressão de planta. Os Exemplos de tais modificações de seqüência incluem, porém sem limitação, um conteúdo alterado de G/C para aproximar-se aquele tipicamente encontrado nas espécies de interesse da planta, e a remoção de códons atipicamente encontrados nas espécies de planta, comumente denominado 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 se aproxima da utilização de códon na planta de interesse. Portanto, um gene otimizado ou seqüência de ácido nucléico 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 favorecidos ou estatisticamente preferidos códons na planta. A seqüência de nucleotídeo tipicamente é examinada no nível de DNA e a região de codificação otimizada para expressão nas espécies de planta determinadas usando qualquer procedimento adequado, por exemplo, conforme descrito em Sardana et al. (1996, Relatórios de Célula de Planta 15:677-681). Nesse método, o desvio padrão da utilização de códon, uma medida da inclinação de utilização do códon, pode ser calculado ao primeiro encontrar o desvio proporcional quadrado de utilização de cada códon do gene nativo relativo ao dos genes de planta altamente expressos, seguido por um cálculo do desvio quadrado médio. A fórmula usada é: 1 SDCU = n = 1 N [(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 de códons no gene de interesse. Uma tabela de utilização do códon a partir de genes altamente expressos das plantas dicotiledôneas é compilada usando os dados de Murray et al. (1989, Res. de Ácido Nucléico 17:477-498).

Um método para otimizar a seqüência de ácido nucléico em conformidade com a utilização

preferida do códon para um tipo de célula específico de planta é com base no uso direto, sem realizar quaisquer cálculos estatísticos extra, das tabelas de otimização de códon, tais como aquelas fornecidas on-line no Banco de Dados de Utilização do Códon por meio do banco de DNA do NIAS (Instituto Nacional de Ciência Agro-biológica) no Japão (http://www.kazusa.ou.jp/códon/). O Banco de Dados de Utilização do Códon contém as tabelas de utilização do códon para um número de diferentes espécies, com cada tabela de utilização do códon tendo sido estatisticamente determinada com base nos dados presentes no Genbank.

Ao usar as tabelas acima de modo a 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 com códon otimizado para tal espécie específica de planta. Isso é efetuado ao substituir os códons que possam ter uma baixa incidência estatística no genoma específico da espécie com os códons correspondentes, com relação a um aminoácido, que são estatisticamente mais favorecidos. 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 cortar e unir segmentos juntos para produzir uma seqüência correta de comprimento total), ou para eliminar as

seqüências de nucleotídeo que possam negativamente afetar a estabilidade ou expressão do mRNA.

A seqüência de nucleotídeo de codificação naturalmente ocorrente já pode, antes de qualquer modificação, conter um número de códons que correspondem a um códon estatisticamente favorecido em uma espécie especifica de planta. Portanto, a otimização de códon da seqüência nativa de nucleotídeo pode compreender a determinação de quais códons, dentro da seqüência nativa de nucleotídeo, não são estatisticamente favorecidos com relação a uma planta específica, e modificação desses códons em conformidade com uma tabela de utilização do 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 do códon da planta, contanto que a proteína codificada pela seqüência de nucleotídeo modificada seja produzida em um nível mais alto do que a proteína codificada pelo correspondente gene naturalmente ocorrente ou gene nativo. A construção dos genes sintéticos ao alterar a utilização do códon é descrita em, por exemplo, Pedido de Patente PCT 93/07278.

Dessa forma, a invenção abrange as seqüências de ácido nucléico acima descritas, seus fragmentos, seqüências hibridizáveis com as mesmas, seqüências homólogas às mesmas, seqüências codificando polipeptídios semelhantes com diferente utilização do códon, seqüências alterada caracterizada por mutações, tal como, exclusão, inserção ou substituição de um ou mais

nucleotídeos, sejam naturalmente ocorrentes ou induzidos pelo homem, sejam aleatoriamente ou com alvo.

Já que as seqüências de polinucleotídeo da invenção codificam polipeptídios previamente não identificados, a invenção também abrange novos polipeptídios ou porções dos mesmos, que são codificados pelos polinucleotídeos isolados e respectivos fragmentos de ácido nucléico dos mesmos acima descritos. As seqüências de aminoácido desses novos polipeptídios são estabelecidas na SEQ ID N°: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791.

A invenção também abrange os homólogos desses polipeptídios, tais homólogos podem ser 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 %, homólogos a uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791.

De acordo com uma realização da invenção, o polipeptídio isolado da invenção é selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791.

A invenção também abrange 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 por homem, seja aleatoriamente ou com alvo.

Conforme acima mencionado e descrito nos Exemplos 8, 9 e 10 da seção de Exemplos que se segue, os presentes inventores isolaram as seqüências do promotor (SEQ ID N°s: 851, 848, 857 ou 854) dos genes envolvidos no desenvolvimento de fibra de algodão [CT4 (SEQ ID N°:842), CT9 (SEQ ID N°:843), CT11 (SEQ ID N°:844) e CT74 (SEQ ID N°: 845)] e demonstraram sua capacidade de direcionar uma expressão de um gene repórter é uma célula de planta.

Dessa forma, de acordo com outro aspecto da invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de ácido nucléico pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 % idêntico à SEQ ID N°: 851, 848, 857 ou 854, caracterizada pelo fato de que a seqüência de ácido nucléico é capaz de regular uma

expressão de uma seqüência heteróloga de polinucleotídeo operativamente ligada à mesma.

Conforme aqui usado, a frase "seqüência heteróloga de polinucleotídeo" refere-se a um polinucleotídeo de uma diferente espécie ou da mesma espécie, porém de um diferente local de gene que a seqüência do polinucleotídeo isolado (p.ex., a seqüência de promotor).

Uma seqüência heteróloga de polinucleotídeo é "operativamente ligada" a uma seqüência regulatória (p.ex., a seqüência de promotor estabelecida pela SEQ ID N°: 851, 848, 857 ou 854), se a seqüência regulatória for capaz de exercer um efeito regulatório sobre a seqüência heteróloga de polinucleotídeo ligada à mesma. Preferivelmente, a seqüência regulatória está posicionada 1-500 bp a montante do códon de ATG da seqüência heteróloga de polinucleotídeo, embora seja apreciado que as seqüências regulatórias também possam exercer seu efeito quando posicionadas em qualquer local com relação à seqüência de codificação de ácido nucléico (p.ex., dentro de um intron).

De acordo com uma realização da invenção, a seqüência de polinucleotídeo isolado deste aspecto da invenção (a seqüência de promotor) compreende menos do que cerca de 1800 ácidos nucléicos em comprimento, p.ex., menos do que cerca de 1500 ácidos nucléicos em comprimento.

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, a seqüência de polinucleotídeo isolado compreende uma seqüência de ácido nucléico conforme

estabelecida pela SEQ ID N°: 851, 857, 848 ou 854.

Conforme acima mencionado e descrito nas Figuras 3a-f, Tabela 12 e Exemplo 10 da seção de Exemplos que se segue, as seqüências de promotores isolados da invenção foram capazes de direcionar uma expressão de um gene repórter (GUS) durante o desenvolvimento de fibra.

De acordo com uma realização da invenção, a seqüência de polinucleotídeo isolado (a seqüência de promotor) da invenção é capaz de regular expressão da seqüência heteróloga de polinucleotídeo em uma célula epidérmica de óvulo.

De acordo com uma realização da invenção, a célula epidérmica de óvulo compreende uma fibra de planta ou um tricoma.

A capacidade dos polinucleotídeos da invenção e seus produtos de regular o desenvolvimento de fibra de algodão pode ser determinada diretamente em pelo menos um parâmetro estrutural de uma fibra de algodão, tal como, o comprimento de fibra ou finura de fibra, ou taxa de crescimento da fibra (ainda descrita abaixo). Alternativamente, o desenvolvimento de fibra de algodão pode ser determinado indiretamente ao usar os sistemas modelo de planta para o desenvolvimento de fibra de algodão, tais como, células de tricoma e radicelas [vide Exemplos 7, 10 e 11 da seção de Exemplos que se segue e Wagner. G.J. et. al. (2004)].

Ao analisar os perfis de

expressão dos polinucleotídeos isolados da invenção e correlacionar entre o perfil de expressão de gene e comprimento da fibra (vide Exemplo 3 e 4 da seção de Exemplos), os presentes inventores foram capazes de determinar o envolvimento das seqüências de biomolécula (i.e., polinucleotídeos e polipeptídios) da invenção na iniciação de fibra e/ou alongamento e biomassa da planta.

Dessa forma, de acordo com ainda outro aspecto da invenção, é fornecido um método para aprimorar a qualidade da fibra e/ou rendimento de uma planta que produz fibra. O método deste aspecto da invenção é efetuado ao expressar exogenamente pelo menos uma porção funcional do polipeptídio isolado da invenção na planta que produz fibra, assim aprimorando a qualidade e/ou rendimento da planta que produz fibra.

Conforme aqui usado, a frase "qualidade da fibra" refere-se a pelo menos um parâmetro de fibra que é agricolamente desejado, ou exigido na indústria de fibra (ainda descrito abaixo). Os Exemplos de tais parâmetros incluem, porém sem limitação, comprimento da fibra, resistência da fibra, adequação da fibra, peso da fibra por comprimento de unidade, proporção de maturidade e uniformidade (ainda descrito abaixo).

A qualidade da fibra de algodão (fio de linho) é tipicamente medida de acordo com o comprimento da fibra, resistência e fineza. De forma correspondente, a qualidade do fio de linho é considerada mais alta quando a fibra é mais longa, mais forte e mais

fina.

Conforme aqui usado, a frase "rendimento da fibra" refere-se à quantia ou quantidade de fibras produzidas a partir da planta que produz fibra.

Conforme aqui usado, o termo "aprimorar" refere-se a pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, alteração na qualidade da fibra/rendimento conforme comparado a uma planta nativa (i.e., não modificado com as seqüências de biomolécula da invenção).

Conforme aqui usado, a frase "expressando exogenamente" refere-se a uma expressão de pelo menos uma porção funcional do polipeptídio isolado da invenção a partir de uma seqüência exógena de polinucleotídeo (i.e., uma seqüência de polinucleotídeo não derivada da célula hospedeira) introduzida na célula hospedeira (uma célula de planta nesse caso).

A seqüência exógena de polinucleotídeo da invenção é projetada e construída para expressar pelo menos uma porção funcional do polipeptídio isolado da invenção (p.ex., a porção capaz de aprimorar o rendimento/qualidade da fibra, aumentando a biomassa). De forma correspondente, a seqüência exógena de polinucleotídeo pode ser uma seqüência de DNA ou RNA codificando uma molécula de polipeptídio, capaz de aprimorar o rendimento ou

quantidade da fibra. Alternativamente, o polinucleotídeo exógeno pode ser uma região regulatória atuando por cis (p.ex., SEQ ID N°: 851, 848 ou 857) que pode ser introduzido na planta para aumentar a expressão de qualquer polinucleotídeo que está envolvido no desenvolvimento de fibra (p.ex., sintase de fosfato de sacarose, conforme descrito na Patente Norte-Americana N° 6.472.588; ou quaisquer seqüências de polinucleotídeo isolado estabelecida pela SEQ ID N°s: 1, 12, 2, 17, 10, 11, 8, 4, 7, 6, 5, 3, 9, 13, 14, 15, 16, 18-129, 259-534 ou 535).

Para expressar os polinucleotídeos exógenos nas células de planta, uma seqüência de polinucleotídeo da invenção pode ser ligada em uma construção de ácido nucléico adequada para a expressão de célula de planta. Tal construção de ácido nucléico inclui pelo menos um elemento regulatório atuante cis operativamente ligado ao polinucleotídeo isolado, tal como, uma seqüência de promotor para direcionar a transcrição da seqüência de polinucleotídeo na célula de uma forma constitutiva ou induzível. O promotor pode ser homólogo ou heterólogo à planta/célula transformada.

As seqüências de promotor que podem ser usadas em conformidade com este aspecto da invenção são os promotores de célula epidérmica.

Por exemplo, as seqüências de promotor de cada uma das seqüências de polinucleotídeo da invenção podem ser usadas nas construções de ácido nucléico da invenção.

De acordo com uma realização deste aspecto da invenção, o promotor é 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 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 100 % idêntico à SEQ ID Nº: 851, 848, 857, ou 854, que é capaz de regular a expressão de pelo menos uma seqüência de polinucleotídeo operativamente ligado ao mesmo em uma célula epidérmica de óvulo.

Outros exemplos de promotores otimizados de fibra de algodão incluem aqueles dos genes expressos de fibra de algodão E6 (John et al., Biol. Mol. de Planta, 30:297-306 (1996) e John et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:12768-12773, 1996), H6 (John et al., Fisiol. de Planta, 108:669-676, 1995), FbL2A (Rinehart et al., Fisiol. de Planta, 112:1331-1341, 1996) e John et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 93:12768-12773, 1996), rac (Delmer et al., Genet. Gen. Mol., 248:43-51, 1995); CelA (Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci EUA, 93:12637-12642, 1996); CAP (Kawai et al., Fisiol. de Célula de Planta 39:1380-1383, 1998); ACP (Song et al, Bioq. Biof. Acta 1351:305-312, 1997); e LTP (Ma et al., Bioq. Biof. Acta 1344:111-114, 1997). Outros

promotores específicos de fibra de algodão são revelados na Patente Norte-Americana N° 5.495.070.

Outros promotores de desenvolvimento de fibra de algodão são revelados em PCT N° IL2005/000627 aos presentes inventores (p.ex., SEQ ID N°: 85 ou 91 no mesmo).

Outros promotores que podem ser usados em conformidade com esse aspecto da invenção são aqueles que somente garantem a expressão em órgãos específicos, tal como, a folha, raiz, tubérculo, semente, caule, flor ou tipos específicos de célula, tal como, parênquima, epidérmico, tricoma ou células vasculares.

Os promotores para otimizar a expressão nas células de tricoma são revelados em WO2004/111183, para Evogene Ltd.

Os promotores otimizando a expressão no tecido vascular incluem o promotor CAD 2 (Samaj et al, Planta, 204:437-443, 1998), promotor Pt4Cll (Hu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 95:5407-5412, 1998), promotor C4H (Meyer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 95:6619-6623, 1998), promotores PtX3H6 e PtX14A9 (Loopstra et al., Biol. Mol. de Planta, 27:277-291, 1995), promotor RolC (Graham, Biol. Mol. de Planta, 33:729-735, 1997), promotor Hvhsp17 (Raho et al., Bot. Expt. J., 47:1587-1594, 1996), e promotor COMT (Capellades et al., Biol. Mol. de Planta, 31:307-322, 1996).

Os promotores otimizando a expressão no tecido de caule incluem os promotores de medula

(Datta, Genet. Apl. Teor., 97:20-30, 1998) e Ohta et al., Genet. Gen. Mol., 225:369-378, 1991), e o promotor de peroxidase aniônico (Klotz et al, Planta Mol. Biol, 36:509-520, 1998). Os promotores preferidos otimizando a expressão em floema, córtex e cortiça, porém não xilema ou medula, inclui o promotor Psam-1 (Mijnsbrugge et al, Planta e Fisiol. de Cel., 37:1108-1115, 1996).

Os promotores otimizando a expressão em sementes incluem o promotor phas (Geest et al., Biol. Mol. de Planta 32:579-588, 1996); o promotor GluB-1 (Takaiwa et al., Biol. Mol. de Planta 30:1207-1221, 1996); o promotor gama-zeína (Torrent et al. Biol. Mol. de Planta 34:139-149,1997), e o promotor oleosina (Sarmiento et al., O Jornal de Planta 11:783-796, 1997).

Outras seqüências de promotor que mediam a expressão constitutiva, induzível, específica de tecido ou específica de etapa de desenvolvimento, são reveladas em WO2004/081173 para Evogene Ltd.

Os promotores truncados ou sintéticos incluindo as regiões específicas de nucleotídeo conferindo a expressão otimizada de tecido também podem ser usadas, conforme exemplificado por identificação dos elementos regulatórios dentro de promotores maiores conferindo expressão otimizada por xilema (Seguin et al., Biol. Mol. de Planta, 35:281-291, 1997; Torres-Schumann et al., O Jornal de Planta, 9:283-296, 1996; e Leyva et al., A Célula de Planta, 4:263-271, 1992).

A construção de ácido nucléico

pode ser, por exemplo, um plasmídio, um bacmídeo, um fagemídeo, a cosmídeo, a fago, um vírus ou um cromossomo artificial. Preferivelmente, a construção de ácido nucléico da invenção é um vetor de plasmídio, mais preferivelmente um vetor binário.

A frase "vetor binário" refere-se a um vetor de expressão que transportar uma região T modificada a partir do plasmídio Ti, capaz de ser multiplicado tanto nas células de E. coli quanto nas de Agrobacterium, e normalmente compreendendo o(s) gene(s) repórter (es) para transformação de planta entre as duas regiões de borda. Um vetor binário adequado para a invenção inclui pBI2113, pBI121, pGA482, pGAH, pBIG, pBI101 (Clonetech), pPI (vide Exemplos 5 e 10 da seção de Exemplos que se segue) ou suas modificações.

A construção de ácido nucléico da invenção pode ser utilizada para transformar uma célula hospedeira (p.ex., bacteriano, planta) ou planta.

Conforme aqui usado, os termos "transgênico" ou "transformado" são usados de forma intercambiável com referência a uma célula ou uma planta na qual o material genético clonado foi transferido.

Na transformação estável, a molécula de ácido nucléico da invenção é integrada no genoma da planta, e como tal representa um traço estável e herdado.

Na transformação transitória, a molécula de ácido nucléico é expressa pela célula transformada, porém não integrada no genoma, e como tal

representa um traço transitório.

Existem diversos métodos para introduzir os genes estrangeiros em ambas as plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Potrykus, I. (1991). Rev. An. Planta Biol. Mol. de Planta Fisiol. 42, 205-225; Shimamoto, K. et al. (1989). Plantas férteis de arroz transgênico regeneradas a partir de protoplastos transformados. Nature (1989) 338, 274-276).

Os métodos principais da integração estável do DNA exógeno no DNA genômico de planta incluem duas abordagens principais:

(i) Transferência de gene mediado por Agrobacterium. Vide: Klee, H. J. et al. (1987). Rev. An. Fisiol. de Planta 38, 467-486; Klee, H. J. e Rogers, S. G. (1989). Cultura de Célula e Genética de Célula Somática das Plantas, Vol. 6, Biologia Molecular dos Genes Nucleares de Planta, pp. 2-25, J. Schell e L. K. Vasil, eds., Academic Publishers, San Diego, Cal.; e Gatenby, A. A. (1989)- Regulação e Expressão dos Genes de Planta em Microorganismos, pp. 93-112, Biotecnologia de Planta, S. Kung e C. J. Arntzen, eds., Butterworth Publishers, Boston, Mass.

(ii) Captação Direta de DNA. Vide, p.ex.: Paszkowski, J. et al. (1989). Cultura de Célula e Genética de Célula Somática de Plantas, Vol. 6, Biologia Molecular dos Genes Nucleares de Planta, pp. 52-68, J. Schell e L. K. Vasil, eds., Academic Publishers, San Diego, Cal.; e Toriyama, K. et al. (1988). Bio/Tecnol 6, 1072-1074 (métodos para captação direta de DNA em protoplastos). Vide também: Zhang et al.

(1988). Rep de Célula de Planta 7, 379-384; e Fromm, M. E. et al. (1986). Transformação estável de milho após a transferência de gene por eletroporação. Natureza 319, 791-793 (Captação de DNA induzida por choque elétrico breve das células de planta). Vide também: Klein et al. (1988). Bio/Tecnologia 6, 559-563; McCabe, D. E. et al. (1988). Transformação estável da soja (Glycine max) por aceleração de partícula. Bio/Tecnologia 6, 923-926; e Sanford, J. C. (1990). Transformação de planta biolística. Planta Fisiol. 79, 206-209 (Injeção de DNA nas células de planta ou tecidos por bombardeio de partícula). Vide também: Neuhaus, J. M. et al. (1987). Genet. Apl. Teor. 75, 30-36; e Neuhaus, J. M. e Spangenberg, G. C. (1990). Planta Fisiol. 79, 213-217 (uso de sistemas de micropipeta). Vide Patente Norte-Americana N° 5.464.765 (transformação de pêlo de carboneto de silício ou fibras de vidro das culturas de célula, embriões ou tecidos de calo). Vide também: DeWet, J. M. J. et al. (1985). "Transferência de gene exógeno no milho (Zea mays) usando pólen tratado por DNA," Manipulação Experimental do Tecido de Óvulo, G. P. Chapman et al., eds., Longman, New York-London, pp. 197-209; e Ohta, Y. (1986). Transformação Genética de Alta Eficiência do Milho por uma Mistura de Pólen e DNA Exógeno. Proc Natl Acad Sci EUA 83, 715-719 (incubação direta do DNA com pólen de germinação).

Os sistemas mediados por Agrobacterium incluem o uso dos vetores de plasmídio que contêm os segmentos definidos de DNA que se integram ao DNA genômico de planta. Os métodos de inoculação do tecido de

planta variam dependendo da espécie de planta e o sistema de entrega de Agrobacterium. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco de folha, que pode ser realizado com qualquer explante de tecido que fornece uma boa fonte para iniciação da diferenciação de toda a planta (Horsch, R. B. et al. (1988). "Transformação de disco de folha." Manual de Biologia Molecular de Planta A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). Uma abordagem complementar emprega o sistema de entrega de Agrobacterium em combinação com a infiltração a vácuo. O sistema de Agrobacterium é especialmente útil na criação de plantas dicotiledôneas transgênicas.

Existem diversos métodos de transferência DNA nas células de planta. Na eletroporação, os protoplastos são brevemente expostos a um forte campo elétrico, abertura de mini-poros para permitir que o DNA entre. Na micro-injeção, o DNA é mecanicamente injetado diretamente nas células usando micro-pipetas. No bombardeio de micro-partícula, o DNA é adsorvido em micro-projéteis, tal 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 transferência estável, a propagação da planta ocorre. O método mais comum da propagação de planta é por semente. A desvantagem da regeneração por propagação de semente, entretanto, é a falta de uniformidade na safra devido à heterozigosidade, já que as sementes são produzidas por plantas de acordo com as

variâncias genéticas regidas pelas regras de Mendelian. Em outras palavras, cada semente é geneticamente diferente e cada uma crescerá com seus próprios traços específicos. Portanto, é preferido que a regeneração seja efetuada de modo que a planta regenerada possua traços e características idênticos aos da planta transgênica precursora. O método preferido para regenerar uma planta transformada é por micro-propagação, que fornece uma reprodução rápida e consistente das plantas transformadas.

A micro-propagação é um processo para cultivar as plantas de segunda geração a partir de uma única amostra de tecido extirpada a partir de uma planta ou cultivar precursora selecionada. Esse processo permite a reprodução de massa das plantas com o tecido preferido e expressando uma proteína de fusão. As plantas recém-geradas são geneticamente idênticas a, e possuem todas as características de, a planta original. A micro-propagação permite a produção de massa do material de planta de qualidade em um curto período de tempo e oferece uma rápida multiplicação dos cultivares selecionados, com a preservação das características da planta original transgênica ou transformada. As vantagens desse método de clonagem de planta incluem a velocidade de multiplicação da planta e a qualidade e uniformidade das plantas produzidas.

A micro-propagação é um procedimento de etapas múltiplas que exige a alteração do meio de cultura ou condições de crescimento entre as etapas. O processo de micro-propagação envolve quatro etapas

básicas: etapa um, cultura inicial de tecido; etapa dois, multiplicação de cultura de tecido; etapa três, diferenciação e formação de planta; e etapa quatro, cultura e endurecimento em estufa. Durante a etapa um, a cultura de tecido é estabelecida e certificada livre de contaminante. Durante a etapa dois, a cultura de tecido inicial é multiplicada até um número suficiente de amostras de tecido ser produzido para atender as metas de produção. Durante a etapa três, as amostras de tecido recém-cultivadas são divididas e cultivas 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 podem continuar a cultivar no ambiente natural.

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

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

Os vírus que demonstraram como úteis para a transformação dos hospedeiros de planta incluem o Vírus Mosaico de Couve-Flor (CaMV), vírus mosaico de tabaco (TMV) e baculovírus (BV). A transformação de plantas usando vírus de planta é descrita em, por exemplo: Patente Norte-Americana N° 4.855.237 (vírus mosaico dourado de

feijoeiro, BGMV); EPA 67.553 (TMV); Pedido Publicado Japonês N° 63-14693 (TMV); EPA 194.809 (BV); EPA 278.667 (BV); e Gluzman, Y. et al. (1988). Comunicações em Biologia Molecular: Vetores Virais, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova York, pp. 172-189. O uso das partículas de pseudo-vírus na expressão do DNA estrangeiro em muitos hospedeiros, incluindo as plantas, é descrita em WO 87/06261.

A construção dos vírus de RNA de planta para a introdução e expressão das seqüências exógenas não virais de ácido nucléico nas plantas é demonstrada pelas referências acima, bem como por: Dawson, W. O. et al. (1989). Um híbrido de vírus mosaico de tabaco expressa e perda um gene adicionado. Virologia 172, 285-292; French, R. et al. (1986) Science 231, 1294-1297; e Takamatsu, N. et al. (1990). Produção de enquefalina nos protoplastos de tabaco usando o vetor de RNA do vírus mosaico de tabaco. FEBS Lett 269, 73-76.

Se o vírus de transformação é um vírus de DNA, aquele com habilidade na técnica, este pode realizar modificações adequadas ao próprio vírus. Alternativamente, o vírus pode primeiro ser clonado em um plasmídio bacteriano para facilidade de construção do vetor viral desejado com o DNA estrangeiro. O vírus pode ser então retirado do plasmídio. Se o vírus for um vírus de DNA, uma origem bacteriana de replicação pode ser anexada ao DNA viral, que é então replicado pela bactéria. A transcrição e conversão do DNA produzirão a proteína de revestimento, a qual 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 genéticas da planta. O vírus de RNA é então transcrito a partir da seqüência viral do plasmídio, seguido pela conversão dos genes virais para produzir as proteínas de revestimento que encapsulam o RNA viral.

A construção dos vírus de RNA de planta para a introdução e expressão nas plantas de seqüências exógenas não virais de ácido nucléico, tais como, aquelas incluídas na construção da invenção, é demonstrando as referências acima, bem como na Patente Norte-Americana N° 5.316.931.

Em uma realização, é fornecido para inserção um ácido nucléico viral de planta, compreendendo uma exclusão da seqüência de codificação de proteína nativa de revestimento, a partir do ácido nucléico viral, uma seqüência de codificação viral de planta não nativa (estrangeira), e um promotor não nativo, preferivelmente o promotor sub-genômico da seqüência de codificação de proteína não nativa de revestimento, e capaz de expressão na planta hospedeira, acondicionamento do ácido nucléico viral de planta recombinante, e garantir uma infecção sistêmica do hospedeiro pelo ácido nucléico viral de planta recombinante. Alternativamente, a seqüência de codificação de proteína nativa de revestimento pode ser feita não passível de transcrição por inserção da seqüência não nativa de ácido nucléico dentro da mesma, de modo que uma proteína não nativa é produzida. A construção de ácido

nucléico viral de planta recombinante pode conter um ou mais promotores sub-genômicos não nativos adicionais. Cada promotor sub-genômico não nativo é capaz de transcrever ou expressar os genes adjacentes ou seqüências de ácido nucléico na planta hospedeira e incapaz de recombinação entre si e com promotores sub-genômicos nativos. Além disso, a construção de ácido nucléico viral de planta recombinante pode conter um ou mais elementos regulatórios atuantes cis, tais como, otimizadores, que aglutinam um regulador de transação e regulam a transcrição de uma seqüência de codificação localizada a jusante ao mesmo. As seqüências não nativas de ácido nucléico podem ser inseridas adjacentes ao promotor sub-genômico viral de planta nativa ou promotores sub-genômicos virais de planta não nativos e nativos se mais de uma seqüência de ácido nucléico for incluída. As seqüências não nativas de ácido nucléico são transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle do(s) promotor(es) sub-genômico(s) para produzir os produtos desejados.

Em uma realização da invenção, uma construção de ácido nucléico viral de planta recombinante é fornecida conforme na primeira realização, exceto que a seqüência de codificação de proteína nativa de revestimento é colocada adjacente a um dos promotores sub-genômicos de proteína de revestimento não nativos ao invés de adjacente a uma seqüência de codificação de proteína não nativa de revestimento.

Em uma realização da invenção,

uma construção de ácido nucléico viral de planta recombinante é fornecida compreendendo um gene de proteína de revestimento nativo colocado adjacente ao seu promotor sub-genômico e um ou mais promotores sub-genômico não nativos inseridos na construção de ácido nucléico viral. Os promotores sub-genômicos não nativos inseridos são capazes de transcrever ou expressar genes adjacentes em uma planta hospedeira e são incapazes de recombinação entre si e com promotores sub-genômicos nativos. As seqüências não nativas de ácido nucléico podem ser inseridas adjacentes aos promotores virais de planta sub-genômica 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 realização da invenção, uma construção de ácido nucléico viral de planta recombinante é fornecida conforme na terceira realização, exceto que a seqüência de codificação de proteína nativa de revestimento é substituída por uma seqüência de codificação de proteína não nativa de revestimento.

Os vetores virais são encapsulados por proteínas expressas de revestimento codificadas por construções de ácido nucléico virais de planta recombinante conforme acima descrito, para produzir um vírus de planta recombinante. A construção de ácido nucléico viral de planta recombinante ou o vírus de planta recombinante é usado para infeccionar as plantas hospedeiras apropriadas. A construção de ácido nucléico viral de planta

recombinante é capaz de replicação em um hospedeiro, difusão sistêmica dentro do hospedeiro, e transcrição ou expressão de um ou mais genes estrangeiros (ácido nucléico isolado) no hospedeiro para produzir a proteína desejada.

Além do acima, a molécula de ácido nucléico da invenção também pode ser introduzida em um genoma de cloroplasto assim permitindo a expressão de cloroplasto.

Uma técnica para introduzir as seqüências de ácido nucléico 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 a cerca de um. Então, o ácido nucléico exógeno é introduzido nas células preferivelmente via bombardeio de partícula, com o objetivo de introduzir pelo menos uma molécula de ácido nucléico exógeno nos cloroplastos. O ácido nucléico exógeno é selecionado por aquele com habilidade ordinária na técnica para ser capaz de integração ao genoma do cloroplasto via recombinação homóloga, que é prontamente efetuado por enzimas inerentes ao cloroplasto. Para essa finalidade, o ácido nucléico exógeno compreende, além de um gene de interesse, pelo menos uma seqüência de ácido nucléico, derivada a partir do genoma do cloroplasto. Além disso, o ácido nucléico exógeno compreende um marcador selecionável, o qual por procedimentos de seleção seqüencial serve para permitir que um artesão determine que todas ou substancialmente todas as

cópias do genoma de cloroplasto após tal seleção inclua o ácido nucléico exógeno. Os detalhes adicionais relacionados a essa técnica são encontrados nas Patentes Norte-Americanas N°s 4.945.050 e 5.693.507, as quais são aqui incorporadas por referência. Um polipeptídio pode assim ser produzido pelo sistema de expressão de proteína do cloroplasto e tornar-se integrado à membrana interna do cloroplasto.

Será apreciado que a geração da planta que produz fibra de traços desejados de acordo com a invenção também pode ser efetuada ao cruzar cada uma das plantas geneticamente modificadas acima com o tipo selvagem, plantas híbridas ou transgênicas, usando métodos que são bem conhecidos na técnica.

Assim que as plantas transgênicas da invenção são geradas, as fibras são colhidas (por exemplo, por colheita mecânica e/ou retirada manual) e o rendimento da fibra e a qualidade são determinados.

O seguinte descreve os métodos das fibras de algodão de qualificação.

Comprimento da fibra - Instrumentos, tais como, sistemas de fibrógrafo e HVI (instrumentação de alto volume) são usados para medir o comprimento da fibra. Os instrumentos de HVI computam o comprimento em termos de comprimento "médio" e "médio parcial superior" (UHM). A média é o comprimento médio de todas as fibras enquanto UHM é o comprimento médio da parcial mais longa de distribuição da fibra.

Resistência da fibra -

Conforme mencionado, a resistência da fibra é normalmente definida como a força exigida para quebrar um fardo de fibras ou uma única fibra. No teste de HVI, a força de ruptura é convertida para "força de gramas por unidade tex." Essa é a força exigida para quebrar um fardo de fibras que é uma unidade tex em tamanho. No teste de HVI, a resistência é fornecida em gramas por unidades tex (gramas/tex). As fibras podem ser classificadas como baixa resistência (p.ex., 19-22 gms/tex), resistência média (p.ex., 23-25 gms/tex), alta resistência (p.ex., 26-28 gms/tex), e resistência muito alta (p.ex., 29-36 gms/tex).

Fineza da fibra a e peso da fibra por comprimento de unidade — fineza aumentada de fibra é provavelmente atribuível à espessura de parede de fibra aumentada produzindo mais peso por comprimento de unidade.

Proporção de maturidade - é uma medida da quantia relativa de celulose em seção cruzada de fibra.

Uniformidade - O grau em que as fibras em uma amostra são uniformes é com base na proporção do comprimento médio ao comprimento médio parcial superior, fornecido como uma porcentagem.

Micronaire - A leitura de micronaire de uma fibra é obtida a partir de um teste de fluxo de ar poroso. O teste é conduzido conforme segue. Uma amostra pesada de algodão é comprimida em determinado volume e o fluxo de ar controlado é passado através da amostra. A resistência ao fluxo de ar é lida como unidades de

micronaire. As leituras de micronaire refletem uma combinação de maturidade e fineza. Já que o diâmetro de fibra das fibras em determinada variedade do algodão é consistente de forma justa, o índice de micronaire mais provavelmente indicará a variação de maturidade ao invés das variações na fineza. Uma leitura de micronaire de 2,6-2,9 é baixa enquanto 3,0-3,4 está abaixo da média, 3,5-4,9 é a média e 5,0 e acima são altos. Para a maioria das aplicações têxteis, um micronaire de 3,5-4,9 é usado. Qualquer valor mais alto do que isso não é normalmente desejável. Portanto, será apreciado que as diferentes aplicações exigem diferentes propriedades de fibra. Dessa forma, fica entendido que uma propriedade de fibra que é desvantajosa em uma aplicação poderia ser vantajosa em outra.

Conforme é ilustrado na seção de Exemplos que se segue, as seqüências de biomolécula da invenção são capazes para aumentar o comprimento e número de pêlo de folha/tricoma, bem como o pêlo de semente. Conforme tais biomoléculas da invenção podem ser usadas para gerar as plantas transgênicas com número/comprimento aumentado de tricoma que melhor impede os herbívoros, orientam a via de polinizadores, ou afetam a fotossíntese, temperatura da folha ou perda de água por meio de refletância de luz aumentada. Adicionalmente, tais plantas transgênicas podem ser usadas para a produção compartimentalizada das proteínas recombinantes e produtos químicos em tricomas, conforme descrito em detalhes em WO2004/111183 para Evogene Ltd.

Os presentes inventores também

averiguaram que as seqüências de polinucleotídeo e polipeptídio da invenção são capazes de aumentar a biomassa de uma planta. Será apreciado que a capacidade dos polipeptídios da invenção para aumentar o rendimento/biomassa/vigor da planta é inerente a sua capacidade de promover o aumento no tamanho da célula de planta ou volume (conforme aqui descrito).

Dessa forma, a invenção também considera um método para aumentar uma biomassa/vigor/rendimento de uma planta. Isso é efetuado por regulação ascendente da expressão e/ou atividade de pelo menos um dos polinucleotídeos da invenção, conforme acima descrito.

Conforme aqui usado, a frase "planta biomassa" refere-se à quantia ou quantidade de tecido produzido a partir da planta em uma temporada de cultivo, o que também poderia determinar ou afetar o rendimento da planta ou rendimento conforme área de cultivo.

Conforme aqui usado, a frase "vigor da planta" refere-se à quantia ou quantidade de tecido produzido a partir da planta em determinado tempo. Assim, o aumento do vigor poderia determinar ou afetar o rendimento da planta ou rendimento conforme tempo de cultivo ou área de cultivo.

Conforme aqui usado, a frase "rendimento da planta" refere-se à quantia ou quantidade de tecido produzido e colhido conforme a planta produziu o

produto. Assim, o aumento do rendimento poderia afetar o beneficio econômico que pode ser obtido a partir da planta em determinado tempo de área de cultivo e/ou tempo de cultivo.

Conforme aqui usado, o termo "aumento" refere-se a pelo menos cerca de 5 %, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, de aumento no rendimento da planta/biomassa/vigor/ou tolerância ao stress abiótico (abaixo descrito) conforme comparado a uma planta nativa (i.e., não modificada com as seqüências de biomolécula da invenção).

Conforme as seqüências foram escolhidas por sua capacidade de aumentar as pontas de raiz e fibras, as seqüências reveladas podem ser usadas para aumentar a tolerância ou aprimorar a resistência ao stress abiótico.

A frase "stress abiótico" aqui usado refere-se a qualquer efeito adverso sobre o metabolismo, crescimento, reprodução e/ou viabilidade de uma planta. De forma correspondente, o stress abiótico pode ser induzido por condições sub-ideais de crescimento ambiental, tais como, por exemplo, salinidade, seca, inundação, baixa ou alta temperatura, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutriente, poluição atmosférica ou irradiação por UV.

A frase "tolerância ao stress abiótico" conforme aqui usada refere-se à capacidade de uma planta expressando exogenamente as seqüências de biomolécula da invenção para suportar um stress abiótico sem sofrer uma alteração substancial no metabolismo, crescimento, produtividade e/ou viabilidade conforme comparado a uma planta nativa (i.e., não modificada com as seqüências de biomolécula da invenção) sob as mesmas condições de stress abiótico.

Adicional ou alternativamente, tais parâmetros podem ser medidos nas plantas expressando exogenamente as seqüências de biomolécula da invenção e podem ser comparados aos mesmos parâmetros conforme medidos nas plantas nativas (i.e., não modificadas com as seqüências de biomolécula da invenção, p.ex., plantas do tipo selvagem) após expor as plantas às mesmas condições de stress abiótico.

Será apreciado que qualquer planta é considerada em conformidade com essas realizações da invenção. Uma planta adequada para uso com o método da invenção pode ser qualquer planta monocotiledônea ou dicotiledônea, incluindo, porém sem limitação, milho, trigo, cevada, centeio, aveia, arroz, soja, amendoim, ervilha, lentilha e alfafa, algodão, semente de colza, canola, pimenta, girassol, batata, tabaco, tomate, berinjela, eucalipto, uma árvore, uma planta ornamental, uma gramado perene e uma safra de forragem, plantas coníferas, musgo, alga, bem como outras plantas listadas em

www.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae.

A invenção também abrange um método para produzir fibras de algodão através de (a) gerar uma planta transgênica de algodão expressando exogenamente o polipeptídio isolado da invenção e (b) colher as fibras da planta transgênica de algodão.

Dessa forma, a invenção é de alto valor agrícola para promover o rendimento de safras comercialmente desejadas (p.ex., biomassa de órgão vegetativo, tal como, madeira de álamo, ou órgão reprodutivo, tal como, número de sementes ou biomassa de semente).

Conforme é ainda mostrado nas Figuras 6 e 7 e descritas no Exemplo 11 da seção de Exemplos que se segue, os presentes inventores construíram vetores projetados para expressar um gene de desenvolvimento de fibra de algodão (p.ex., CT20; SEQ ID N°: 881) sob um promotor constitutivo (p.ex., promotor 35S; SEQ ID N°: 841) e um gene repórter (p.ex., GFP; SEQ ID N°: 871) sob a regulação de transcrição de um promotor de desenvolvimento de fibra de algodão promotor (p.ex., promotor CT2; SEQ ID N°: 873), de modo que a expressão do gene repórter localiza as fibras que foram transformadas com a construção (p.ex., ao observar as fibras com a luz apropriada, p.ex., luz UV para detectar a coloração de GFP).

Dessa forma, de acordo com outro aspecto da invenção, é fornecida uma construção de ácido nucléico compreendendo: (i) uma primeira seqüência de

polinucleotídeo que compreende um gene repórter operativamente ligado a um promotor específico de fibra; e (ii) uma segunda seqüência de polinucleotídeo que compreende uma seqüência heteróloga de ácido nucléico codificando um polipeptídio de interesse operativamente ligado a um promotor.

Será apreciado que a primeira e a segunda seqüências de polinucleotídeo também podem ser construídas cada um em uma construção separada de ácido nucléico que conjuntamente formam um sistema da construção de ácido nucléico.

Dessa forma, de acordo com ainda outro aspecto da invenção, é fornecido um sistema da construção de ácido nucléico compreendendo: (i) uma primeira construção de ácido nucléico que compreende uma primeira seqüência de polinucleotídeo compreendendo um gene repórter operativamente ligado a um promotor específico de fibra; e (ii) uma segunda construção de ácido nucléico que compreende uma segunda seqüência de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência heteróloga de ácido nucléico codificando um polipeptídio de interesse operativamente ligado a um promotor.

O promotor específico de fibra pode ser qualquer promotor conhecido por regular o desenvolvimento de fibra (p.ex., otimizar o desenvolvimento de fibra) ou que é especificamente expresso em fibras. Os exemplos não limitantes dos promotores específicos de fibra incluem o promotor CT2 conforme estabelecido pela SEQ ID N°:

873; o promotor CT4 conforme estabelecido pela SEQ ID N°: 848; o promotor CT74 estabelecido pela SEQ ID N°: 851, ou promotores estabelecidos pela SEQ ID N°: 857 ou 854.

O gene repórter pode ser qualquer seqüência de codificação de ácido nucléico codificando um polipeptídio detectável (i.e., um polipeptídio que pode ser detectado após a expressão em uma célula hospedeira). Os exemplos não limitantes dos genes repórteres incluem a seqüência de codificação GFP (p.ex., SEQ ID N°: 871), o GUSIntrão (SEQ ID N°: 872) e o cDNA codificando uma proteína HaloTag não fluorescente (Acessão de GenBank N° AY773970), cuja seguinte expressão em uma célula é reagida com um ligante HaloTag apropriado incluindo uma ligação reativa que aglutina-se de forma covalente à proteína HaloTag e um grupo repórter flexível que pode ser um fluoróforo (Lang C, et al., 2006, J. Exp. Bot. 57: 2985-92).

O polipeptídio de interesse que é expresso na planta pode ser qualquer polipeptídio que é benéfico à planta. Por exemplo, tal polipeptídio pode ser um polipeptídio que regula o desenvolvimento de fibra, tal como quaisquer dos polipeptídios isolados acima descritos (SEQ ID N°s: 130, 141, 131, 146, 139, 140, 137, 133, 136, 135, 134, 132, 138, 142, 143, 144, 145, 147-258 e 536-791) ou em PCT IL2005/000627 para Evogene Ltd. (p.ex., o polipeptídio codificado pela seqüência de codificação CT20 estabelecida pela SEQ ID N°: 881).

Os exemplos não limitantes das

seqüências heterólogas de ácido nucléico codificando o polipeptídio de interesse incluem quaisquer das seqüências de polinucleotídeo isolado da invenção (p.ex., SEQ ID N°s: 1-129, e 259-535).

De acordo com uma realização da invenção, a seqüência heteróloga de ácido nucléico é operativamente ligada a um promotor constitutivo (p.ex., o promotor 35S conforme estabelecido pela SEQ ID N°:841; promotor de Actina (McElroy et al, Célula de Planta, 2: 163-171, 1990); CaMV 19S (Nilsson et al, Planta Fisiol. 100:456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al, Planta J Nov;2(6):837-44, 1992); Ciclofilina de arroz (Bucholz et al, Biol. Mol. de Planta 25(5):837-43, 1994); ubiquitina (Christensen et al, Biol. Mol. de Planta 18: 675-689, 1992); histona H3 de milho (Lepetit et al, Genet. Gen. Mol. 231: 276-285, 1992); Actina 2 (An et al, Planta J. 10(1);107-121, 1996).

De acordo com uma realização da invenção, a seqüência heteróloga de ácido nucléico é operativamente ligada a um promotor específico de fibra (p.ex., o promotor CT2 conforme estabelecido pela SEQ ID N°:873 ou promotor CT4 conforme estabelecido pela SEQ ID N°:848).

Os exemplos não limitantes das construções adequadas de ácido nucléico são ilustrados nas Figuras 6 e 7.

Tais sistemas/construções de ácido nucléico podem ser usados para expressar de forma transitória um polipeptídio de interesse (p.ex., uma fibra

de algodão desenvolvendo polipeptídeo) em uma planta (p.ex., uma planta de algodão).

Enquanto ainda reduz a invenção à prática, os presentes inventores consideraram uma nova abordagem para expressar de forma transitória um polipeptídio de interesse (p.ex., uma fibra de algodão desenvolvendo o polipeptídio) nas células de óvulo do algodão ao injetar uma construção de ácido nucléico codificando o polipeptídio de interesse em uma bola de algodão desenvolvida.

Conforme é mostrado nas Figuras 4a-c e descrevem no Exemplo 11 da seção de Exemplos que se segue, as bolas de algodão que foram injetadas com as seqüências de ácido nucléico em, p.ex., 1 e 8 DPA expressaram o gene repórter (beta-glucuronidase, GUS) na bola desenvolvida. Além disso, a expressão transitória dos vetores binários compreendendo a fibra desenvolvendo gene (p.ex., expansina ou CT20) resultou em um efeito significativo sobre o comprimento da fibra (Figuras 5a-c, Tabela 13, Exemplo 11 da seção de Exemplos).

Dessa forma, de acordo com outro aspecto da invenção, é fornecido um método para expressar um polipeptídio de interesse in uma planta de algodão. O método é efetuado ao injetar em uma bola de algodão da planta de algodão uma construção de ácido nucléico que compreende uma seqüência de ácido nucléico codificando o polipeptídio de interesse, assim expressando o polipeptídio de interesse na planta de algodão.

Conforme aqui usado, a frase "bola de algodão" refere-se à fruta do algodão em diversas etapas de desenvolvimento [p.ex., 0, 2, 4 e 6 dias pós-ântese (DPA)].

A injeção da construção de ácido nucléico pode ser injetada diretamente na bola de algodão, usando, p.ex., uma seringa de 1-ml com uma agulha de 0,5-316-mm (BD Pastipak) (Vide Exemplo 11 da seção de Exemplos). Brevemente, a agulha é introduzida em 1 a 2 mm de profundidade no tecido da fruta, e a solução de infiltração contendo a construção de ácido nucléico é injetada na fruta.

De acordo com uma realização da invenção, a expressão é efetuada em uma célula de óvulo da planta de algodão.

Conforme mostrado no Exemplo 11 da seção de Exemplos, as construções de ácido nucléico (p.ex., aquelas descritas nas Figuras 6 ou 7) foram transferidas em uma célula (p.ex., célula de Agrobacterium), e as células transformadas são ainda injetadas na bola de algodão.

Os métodos para transfectar as construções de ácido nucléico na agrobactéria são conhecidos na técnica e ainda descritos acima e no Exemplo 11 da seção de Exemplos que se segue.

Dessa forma, de acordo com uma realização da invenção, o sistema/construção de ácido nucléico da invenção é composto de agrobactéria.

Conforme aqui usado, o termo

"cerca de" refere-se a ± 10 %.

Os termos "compreende", "compreendendo", "inclui", "incluindo", "tendo" e seus conjugados significam "incluindo, porém sem limitação".

O termo "consistindo em" significa "incluindo e limitado a".

O termo "consistindo essencialmente em" significa que a composição, método ou estrutura poderá incluir ingredientes adicionais, etapas e/ou partes, porém somente se os ingredientes adicionais, etapas e/ou partes não alterem de forma relevante as características básicas e novas da composição reivindicada, método ou estrutura.

Conforme aqui usado, a forma singular "um", "o" e "a" inclui as referências de plural, exceto se o contexto claramente afirmar de outro modo. Por exemplo, o termo "um composto" ou "pelo menos um composto" poderá incluir uma pluralidade de compostos, incluindo suas misturas.

Conforme aqui usado, o termo "método" refere-se aos modos, meios, técnicas e procedimentos para realizar determinada tarefa, incluindo, porém sem limitação, aqueles modos, meios, técnicas e procedimentos, sejam conhecidos, ou prontamente desenvolvidos a partir de modos, meios, técnicas e procedimentos conhecidos por profissionais das artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas.

É apreciado que determinadas

características da invenção, as quais são, para clareza, descritas no contexto de realizações separadas, também podem ser fornecidas em combinação em uma única realização. De forma oposta, diversas características da invenção, as quais, para brevidade, descritas no contexto de uma única realização, também podem ser fornecidas separadamente ou em qualquer sub-combinação adequada ou conforme adequado em qualquer outra realização descrita da invenção. Determinadas características descritas no contexto de diversas realizações não são consideradas como características essenciais de tais realizações, exceto se a realização for inoperante sem esses elementos.

Diversas realizações e aspectos da invenção conforme acima delineados e conforme reivindicados na seção de reivindicações encontram suporte experimental nos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

Referência é agora feita aos seguintes exemplos, os quais conjuntamente com as descrições acima, ilustram algumas realizações da invenção de uma forma não limitante.

Referência é agora feita aos seguintes exemplos, os quais conjuntamente com as descrições acima, ilustram a invenção de uma forma não limitante.

Geralmente, a nomenclatura aqui usada e os procedimentos laboratoriais utilizados na invenção incluem as técnicas de DNA moleculares, bioquímicas, microbiológicas e recombinantes. Tais técnicas

são totalmente explicadas na literatura. Vide, por exemplo, "Clonagem Molecular: Um Manual Laboratorial" Sambrook et al., (1989); "Protocolos Atuais em Biologia Molecular" Volumes I -III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al, "Protocolos Atuais em Biologia Molecular", John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "Um Guia Prático para Clonagem Molecular", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "DNA Recombinante", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Análise de Genoma: Uma Série de Manual Laboratorial", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nova 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; "Biologia Celular: Um Guia Laboratorial", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Protocolos Atuais em Imunologia" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Imunologia Clínica e Básica" (8° Edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell e Shiigi (eds), "Métodos Selecionados em Imunologia Celular", W. H. Freeman e Co., Nova York (1980); imunoensaios disponíveis são extensivamente descritos na literatura de patente e 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; "Síntese de Oligonucleotídeo" Gait, M. J., ed. (1984); "Hibridização de Ácido Nucléico" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcrição e Conversão" Hames,

B. D., e Higgins S. J., Eds. (1984); "Cultura Celular Animal" Freshney, R. L, ed. (1986); "Células e Enzimas Imobilizadas" IRL Press, (1986); "Um Guia Prático para Clonagem Molecular" Perbal, B., (1984) e "Métodos em Enzimologia" Vol. 1-317, Academic Press; "Protocolos de PCR: Um Guia para Métodos e Aplicações", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Estratégias para Purificação e Caracterização de Proteína - Um Manual de Curso Laboratorial" CSHL Press (1996); todos os quais são incorporados por referência como se totalmente estabelecidos no presente. Outras referências gerais são fornecidas por todo este documento. Os procedimentos nos mesmos são acreditados como sendo bem conhecidos na técnica e são fornecidos para a conveniência do leitor. Todas as informações lá contidas são aqui incorporadas por referência.

EXEMPLO 1

IDENTIFICAÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DE GENE ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA FIBRA DE PLANTA

Análise Bioinformática

Na identificação de silício dos genes de algodão envolvidos na formação de fibra - Os supostos genes de algodão envolvidos na formação de fibra foram selecionados a partir dos bancos de dados NCBI das etiquetas de seqüência expressa de algodão (ESTs) e cDNAs. As seqüências de banco de dados foram agrupadas e montadas usando o software LEADS™ (Compugen, Tel Aviv, Israel). O agrupamento resultou em mais de 18.700 agrupamentos, cada um

representando um gene diferente. Um sumário de perfil de expressão foi compilado para cada agrupamento, ao combinar todas as palavras-chave incluídas nos registros de seqüência compreendendo o agrupamento. Os genes expressos em excesso na fase de iniciação e alongamento da fibra foram isolados. Os agrupamentos foram então passados por triagem para incluir os polinucleotídeos originando-se de bibliotecas dos tecidos alongados de adição, tais como, pontas de raiz, xilema e tecidos expostos às condições de descoramento. Já que a força principal que atua com a finalidade de alongar a célula é a turgescência celular, além dos tecidos alongados, os genes selecionados foram comparados aos genes expressos conforme stress abiótico, principalmente conforme stress de seca (os detalhes dos genes agrupados e analisados são resumidos na Tabela 1 abaixo). Ao combinar as diferentes perguntas, uma lista de 56 candidatos previstos de gene aprimorando fibra foi criada. Esses genes foram ainda validados usando a análise de expressão de RNA (qRT-PCR).

Tabela 1

Resultados de Agrupamento de Gene

Organismo	Clones de Não Singelton de Saída			
	TIGR		LEADS	
	Seqüências	Clones	Seqüências	Clones
Algodão	92,338	14,325	198,492	18,543
Tomate	148,522	16,247	209,693	16,322
Álamo	231,072	24,382	-	-
Arabidopsis	327,875	19,863	-	-
Espécies adicionais (10)*	1,855,997	174,045	3,076,554	167,956
Total	2655804	248,862	427,661	38,850

Tabela 1: Resultados de agrupamento de gene. *As espécies adicionais que foram usadas são: milho, arroz, sorgo, soja, uva, canola, cevada, morango, pêssego e melão.

EXEMPLO 2

ANÁLISE DOS PERFIS DE EXPRESSÃO DE mRNA ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DE FIBRA DE PLANTA

Para estudar o perfil de expressão de RNA dos genes candidatos identificados conforme descrito no Exemplo 1 acima, uma reação reversa de transcrição seguida por PCR em tempo real (RT-qPCR) foi realizada no RNA extraído a partir das plantas de algodão em diferentes etapas do desenvolvimento de fibra, conforme segue.

Procedimentos Experimentais

Análise Quantitativa de PCR em Tempo Real (qRT PCR) - Para verificar os níveis da especificidade e associação de traço da expressão, a Transcrição Reversa seguindo PCR (RTqPCR) quantitativa (Tempo Real) foi realizada. O RNA total foi extraído a partir das plantas de algodão em diferentes etapas de desenvolvimento de fibra (a partir do dia de ântese até dia 20 - pós-ântese). Para estudar a especificidade da expressão, o RNA de outros tecidos da plantas de algodão foi coletado e analisado para a expressão de controle (i.e., folhas jovens, caules jovens, mature caules, raízes jovens, sépalas, pétalas e estame). Para essa finalidade, o RNA foi extraído a partir do tecido de Algodão usando o protocolo de Extração de RNA de Borato Quente de acordo com www.eeob.iastate.edu/faculty/WendelJ/ultramicrorna.html. A transcrição reversa foi efetuada usando 1,5 µg total de RNA, usando a enzima de Transcriptase Reversa 300 U Super Script

II (Invitrogen), 225 ng de hexâmeros aleatórios de deoxinucleotídeo (Invitrogen), mistura de 500 µM dNTPs (Takara, Japão), 0,2 de volume de x 5 transcriptase reverso (RT) tampão (Invitrogen), 0,01 M Ed DTT, 60 U de RNAsin (Promega), água destilada dupla tratada por DEPC foi adicionada até 37,5 µl. As reações de RT foram incubadas por 50 minutos em 42 °C, seguido por 70 °C por 15 minutos. cDNA foi diluído em 1:20 em Tris EDTA, pH = 8,5 µl do cDNA diluído foi usado para qRT-PCR.

RT-PCR quantitativo foi realizado no cDNA (5 µl), usando a mistura máster x 1 SYBR GREEN PCR (Applied Biosystems), primers dianteiros e reversos de 0,3 µM cada. A máquina de PCR em tempo real ABI7000 foi usada com as seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 vezes de 95 °C por 15 seg. e 1 minuto em 60 °C, seguido por 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos, e 70 vezes de 60 °C por 10 segundos + 0,5 °C de aumento em cada ciclo. Para cada gene, uma curva padrão foi 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 mapa de curva padrão [ct (limite de ciclo) vs. registro (concentração)] deve ter R > 0,98 com uma eficiência na variação de 100 % ± 5 %. Os níveis de expressão (Qtd) medidos no qPCR foram calculados usando a eficiência (E) da reação de amplificação e C.T. correspondente (o ciclo em que as amostras cruzaram o limite) Qtd = E - C.T. As curvas de dissociação obtidas foram inspecionadas para a ausência de produtos ou prime-

dimers de PCR adicionais indesejados. As reações foram repetidas pelo menos duas vezes. O método de cálculo é com base no fato de que as eficiências das reações do GOI (gene de interesse) e dos genes domésticos são semelhantes.

Para normalizar o nível de expressão entre os diferentes tecidos, os primers específicos foram projetados para especificamente hibridizar com os seguintes genes domésticos: Actina (Acessão GenBank N° D88414 SEQ ID N°: 792, Primers dianteiros e reversos estão estabelecidos na SEQ ID N°s: 793 e 794, respectivamente), GAPDH (SEQ ID N°:795), Primers dianteiros e reversos estão estabelecidos na SEQ ID N°s: 796 e 797, respectivamente), e RPL19 (Acessão GenBank N° AI729179, SEQ ID N°:798, Primers dianteiros e reversos estão estabelecidos na SEQ ID N°s: 799 e 800, respectivamente).

Resultados Experimentais

Usando a metodologia acima foi possível identificar os genes que mostram a expressão elevada durante o alongamento de fibra, bem como genes que mostram exclusiva especificidade da fibra de algodão. Os genes que mostraram a expressão elevada durante a ântese que diminuiu durante o alongamento da fibra foram considerados bons candidatos para serem envolvidos na diferenciação e iniciação de fibra. Notavelmente, a metodologia de quantificação acima descrita ao forneceu os níveis absolutos de expressão, porém forneceu bons parâmetros para o escore da expressão relativa de gene ao longo do desenvolvimento de fibra com diferenças tão altas quanto acima de 1000 vezes nos níveis máximos de expressão atingidos por diferentes genes foram detectados (Tabela 2 abaixo).

56 genes de algodão foram avaliados para seu perfil de expressão em diferentes tecidos de algodão (Gossypium hirsutum, var. Acala).

Dois critérios principais foram usados para selecionar os genes de algodão como candidatos que podem estar envolvidos no desenvolvimento de fibra de acordo com seu perfil de RNA, isto é, genes mostrando alto grau de especificidade de expressão da fibra e genes exibindo um nível de expressão, que altera de forma simultânea com o desenvolvimento de fibra. Dezessete genes atendem esses critérios de seleção e foram antecipados como aprimorando o rendimento da fibra e qualidade. Os perfis de expressão e anotação dos 17 genes selecionados são apresentados nas Tabelas 2a e 2b e Tabela 3 abaixo.

Tabela 2a

Perfis de expressão dos 17 genes selecionados

ID de Gene/SEQ ID Nº (nucleotídeo)	0 dpa	2 dpa	5 dpa	10 dpa	15 dpa	20 dpa	25 dpa
CTF101/3	0.036	0.133	0.077	0.071	0.055	0.039	0.050
CTF110/4	0.407	3.192	1.088	1.630	0.043	0.006	0.010
CTF111/5	0.050	0.899	0.649	0.901	0.217	0.013	0.049
CTF113/6	0.015	0.012	0.013	0.009	0.005	0.001	0.001
CTF121/18	0.056	0.020	0.039	0.021	0.013	0.001	
CTF124/7	0.012	0.312	0.288	0.147	0.026	0.002	
CTF126/19	0.008	0.019	0.012	0.003	0.009	0.005	0.002
CTF130/20	0.000	0.006	0.003	0.002	0.001	0.000	0.000
CTF131/21	0.009	0.088	0.050	0.019	0.011	0.004	0.012
CTF132/22	1.300	5.250	2.882	1.553	1.164	1.644	0.567
CTF133/23	0.131	0.313	0.214	0.089	0.150	0.136	0.111
CTF134/24	1.221	0.245	0.232	0.116	0.153	0.369	0.227
CTF135/8	5.869	18.755	10.243	4.512	2.033	1.162	1.934
CTF144/25	1.851	0.851	1.676	1.375	0.220	0.186	0.010
CTF146/26	0.025	0.104	0.108	0.138	0.050	0.022	0.023
CTF150/27	0.009	0.190	0.092	0.102	0.046	0.001	0.001
CTF155/28	0.117	0.236	0.152	0.188	0.145	0.176	0.337

Tabela 2a: Transcrição reversa seguindo PCR quantitativo foi realizada usando PCR em tempo real, nos tecidos das plantas de algodão jovens ou maduras (G. hirsutum var Acala). As quantias relativas do mRNA de cada gene são apresentadas em todos os tecidos examinados, dpa - dias pós-ântese, do óvulo e tecidos de fibras (até 10 dpa) ou somente tecido de fibra (após 10 dpa).

Tabela 2b

Perfis de expressão dos 17 genes selecionados

ID de Gene/SEQ ID Nº (nucleotídeo)	Sépalas	Pétalas	Raízes jovens	Folhas jovens	Botões jovens	Estame	Pestel	0 dpa
CTF101/3	0.018	0.004	0.044	0.015	0.014	0.004	0.013	0.036
CTF110/4	0.026	0.028	0.024	0.736	0.761	0.020	0.010	0.407
CTF111/5	0.015	0.996	0.002	0.031	0.024	0.152	3.288	0.050
CTF113/6	0.008	0.002	0.283	0.002	0.003	0.084	0.002	0.015
CTF121/18	0.023	0.527	0.029	0.001	0.005	0.680	1.079	0.056
CTF124/7	0.001	0.001	0.034	0.004	0.002	0.000	0.003	0.012
CTF126/19	0.016	0.016	0.005	0.004	0.002	0.008	0.017	0.008
CTF130/20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CTF131/21	0.008	0.077	0.001	0.001	0.006	0.830	0.043	0.009
CTF132/22	0.283	0.152	0.035	0.496	1.126	0.590	0.286	1.300
CTF133/23	0.176	0.543	0.072	0.042	0.035	1.117	0.370	0.131
CTF134/24	3.124	0.349	0.179	0.053	0.164	0.289	1.343	1.221
CTF135/8	3.968	2.389	0.076	1.333	3.098	3.326	17.426	5.869
CTF144/25	0.883	0.556	1.314	0.229	0.685	0.759	2.638	1.851
CTF146/26	0.023	0.252	0.029	0.007	0.016	0.067	0.091	0.025
CTF150/27	0.005	0.010	0.000	0.000	0.002	0.079	0.002	0.009
CTF155/28	0.272	0.839	0.126	0.108	0.151	7.598	1.447	0.117

Tabela 2b: A transcrição reversa seguindo PCR quantitativo foi realizada usando PCR é tempo real, nos tecidos de plantas de algodão jovens ou maduras (G. hirsutum var Acala). As quantias relativas de mRNA de cada gene são apresentadas em todos os tecidos examinados, dpa- dias pósântese, do óvulo e tecidos de fibra (até 10 dpa) ou somente tecido de fibra

(após 10 dpa).

Tabela 3

Anotação dos 17 genes selecionados

CTF#	Anotação	Padrão de expressão	Especificidade da Fibra
CTF101	GTPase	Alongamento	Não
CTF110	GDSL-lipase de motivo/proteína semelhante à hidrolase	Alongamento	Não
CTF111	3-cetoacil-sintase de CoA || elongase de ácido graxo	Alongamento	Não
CTF113	Sintase de rafinose	Alongamento	Não
CTF121	Metilesterase de pectina PME1	Alongamento	Não
CTF124	Semelhante à fosfatase ácida	Alongamento	Fibra específica
CTF126	Fator de despolimerização de actina 4	Alongamento	Não
CTF130	Proteína de dedo RING-H2 ATL2M	Alongamento/Iniciação	Fibra específica
CTF131	Glicosiltransferase putativa	Alongamento	Não
CTF132	Proteína semelhante à protease de serina	Alongamento	Não
CTF133	Subunidade de proteasoma	Alongamento	Não
CTF134	Metilesterase de pectina	Alongamento/Iniciação	Não
CTF135	Subunidade alfa de proteasoma tipo 5	Alongamento	Não
CTF144	Precursor de oxidase de ascorbato	Alongamento/Iniciação	Não
CTF146	Quinase de proteína TMK1	Alongamento	Fibra específica
CTF150	Desidrogenase específico de vagem putativa SAC25	Alongamento	Fibra específica
CTF155	Snakin-1	Alongamento	Fibra específica

Tabela 3: Anotação dos 17 genes selecionados com base no banco de dados de NCBI.

EXEMPLO 3

IDENTIFICANDO A CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES CANDIDATOS E COMPRIMENTO DA FIBRA

A correlação entre o comprimento da fibra e expressão dos genes candidatos foi determinada em 10 diferentes linhas de algodão representando uma ampla variedade das características de comprimento da fibra, conforme segue.

Procedimentos Experimentais

Linhas de Algodão - As 10 diferentes linhas de algodão representando a ampla variedade das características de comprimento da fibra incluíram variedades prematuras de G. hirsutum (SA217SD e SA68SD), variedades de G. hirsutum (Tamcot, Macnair, DP90 e ZG236) híbrido de F1 de G. hirsutum e G. barbadense (Acalphi) e alta qualidade de tipo pima (G. barbadense) (S7 e Pima).

Extração do RNA - Desenvolvimento das etapas de fibra, representando diferentes características de fibra, em 5, 10 e 15 de DPA, foram amostradas e o RNA foi extraído conforme descrito no Exemplo 2 acima.

Avaliação do comprimento da fibra - O comprimento da fibra das linhas acima foi medido usando um fibrógrafo. O sistema de fibrógrafo foi usado para computar o comprimento em termos de comprimento "médio parcial superior". A média parcial superior (UHM) é o comprimento médio da metade mais longa de distribuição da fibra. O fibrógrafo mede o comprimento em extensões de vão em determinado ponto pencentual [World Wide Web (ponto) cottoninc (ponto)com/ClassificationofCotton/?Pg=4#Length].

Resultados Experimentais

Dez diferentes linhas de algodão foram cultivadas em Rehovot, Israel, e seu comprimento da fibra foi medido. Os valores de UHM das fibras foram medidos e a correlação entre o nível de expressão do RNA e o comprimento da fibra foram calculados de acordo com a correlação de Pearson [Protocolo de Transferência Hipertexto (http)://davidmlane (ponto) com/hyperstat/A34739 (ponto) html], caracterizado pelo fato de que "R" é o coeficiente de correlação, e o valor P determina a significância da correlação. Os genes com R > 0,4 e P < 0,05 em pelo menos um dos pontos de tempo medidos (i.e., 5, 10 ou 15 dpa) foram considerados como relacionados ao alongamento de fibra e foram ainda selecionados para clonagem e validação (os dados são resumidos na Tabela 4 abaixo).

Tabela 4 - Correlação entre o nível de expressão do RNA e o comprimento da fibra

	5dpa		10dpa		15 dpa	
	R	P	R	P	R	P
TF101	0.51	0.03		--	0.56	0.02
TF110	0.41	0.06	0.41	0.05		
TF111			0.35	0.10	0.40	0.07
TF113	0.34	0.10	0.44	0.05	0.51	0.03
TF121			0.72	0.00	0.65	0.01
TF124					0.50	0.03
TF126			0.47	0.04		
TF131					0.49	0.03
TF132	0.60	0.01			0.45	0.05
TF133	0.69	0.01				
TF134			0.36	0.09		
TF135					0.30	0.13
TF144					0.34	0.10

Tabela 4: A correlação entre o nível de expressão do RNA e o comprimento da fibra são apresentados para três pontos de tempo (5 dpa, 10 dpa e 15 dpa) usando o coeficiente de correlação de Pearson R e os valores p.

EXEMPLO 4

PRODUÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO ALGODÃO E ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE ALTO PRODUTO USANDO O MICRO-ARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEO DO ALGODÃO

Com a finalidade de conduzir a análise de correlação de expressão do gene de alto produto, os presentes inventores usaram o microarranjo de oligonucleotídeo do algodão, projetado e produzido por "Genômico Evolucionário Comparativo do Algodão" [Protocolo de Transferência Hipertexto (http)://cottonevolution (ponto) info/). Esse MicroArranjo de Oligonucleotídeo do Algodão é composto por 12.006 oligonucleotídeos das Tecnologias de DNA Integradas (IDT) derivados a partir de uma montagem de mais de 180.000 ESTs Gossypium sequenciados a partir de 30 bibliotecas de cDNA.

Com a finalidade de definir as correlações entre os níveis da expressão do RNA e comprimento da fibra, as fibras de 8 diferentes linhas de algodão foram analisadas. Essas fibras foram selecionadas mostrando qualidade da fibra muito boa e alto índice do fio de linho (tipos Pima, originando-se de outras espécies de algodão, isto é G. barhadense), diferentes níveis de índices de qualidade e fio de linho de diversas linhas de G. hirsutum: boa qualidade e alto índice do fio de linho (tipo

Acala), e pobre qualidade e curto índice do fio de linho (tipo Tamcot, e variedades antigas). Um resumo do comprimento da fibra das diferentes linhas é fornecido na Tabela 5.

Procedimentos Experimentais

Extração do RNA - As etapas de desenvolvimento de fibra, representando diferentes características da fibra, em 5, 10 e 15 DPA, foram amostradas e o RNA foi extraído conforme descrito no Exemplo 2 acima.

Avaliação do comprimento da fibra - O comprimento da fibra das linhas selecionadas de algodão foi medido usando o fibrógrafo. O sistema de fibrógrafo foi usado para calcular o comprimento em termos do comprimento "médio parcial superior". A média parcial superior (UHM) é o comprimento médio da metade mais longa da distribuição de fibra. O fibrógrafo mede o comprimento em extensões de vão em determinado ponto percentual em World Wide Web (ponto) cottoninc (ponto) com/ClassificationofCotton/?Pg=4#Length].

Resultados Experimentais

Oito diferentes linhas de algodão foram cultivadas em Rehovot, Israel, e seu comprimento da fibra foi medido. Os valores de UHM das fibras são resumidos na Tabela 5 abaixo. O quadrado R foi calculado para cada um dos genes. Os genes com os valores quadrados R superiores a 0,8 e $P < 0,05$ em pelo menos um ponto de tempo, ou a expressão média em diferentes pontos de

tempo, foram selecionados para validação adicional. Os genes selecionados e seus valores quadrados R estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 5

Resumo do comprimento da fibra das 8 diferentes linhas de algodão

Variedade do algodão	Comprimento	
	Médio	STD
SA217 SD	0.89	0.04
SA68 SD	1.01	0.03
Tamcot	1.06	0.01
DP90	1.1	0.08
ZG 236	1.15	0.00
Coker 310	1.21	0.02
S7	1.26	0.02
Pima	1.36	0.00

Tabela 5: São apresentados os meios e os desvios padrão (STD) de 8 diferentes linhas de algodão.

Tabela 6

Serial N°	CTF N°/ SEQ ID N°	5 dpa			10 dpa			15 dpa			AVG		
		R	P	E	R	P	E	R	P	E	R	P	E
1	CTF157/29				0.90	0.01	10.30	0.76	0.03	68.40			
2	CTF158/30	0.79	0.02	34.20	0.79	0.03	66.90				0.96	0.00	0.70
3	CTF159/31	0.79	0.02	33.20	0.97	0.00	0.60						
4	CTF161/32	0.90	0.00	3.80									
5	CTF162/9	0.71	0.05	82.10	0.91	0.00	8.70						
6	CTF163/33	0.82	0.01	21.70	0.93	0.00	4.20				0.89	0.01	7.30
7	CTF164/34	0.84	0.01	14.50				0.80	0.02	40.90	0.94	0.00	1.40
8	CTF165/1	0.92	0.00	2.20	0.93	0.00	5.20				0.91	0.01	4.80
9	CTF166/10				0.86	0.01	24.00				0.87	0.01	11.40
10	CTF167/2				0.90	0.01	12.90				0.90	0.01	5.20
11	CTF168/35	0.77	0.02	40.40	0.94	0.00	3.30				0.94	0.00	1.60
12	CTF169/11				0.97	0.00	0.80						
13	CTF170/36	0.84	0.01	14.60	0.91	0.00	9.50				0.95	0.00	1.10
14	CTF171/37	0.75	0.03	53.10	0.96	0.00	1.50						
15	CTF172/12	0.77	0.02	41.10	0.81	0.03	51.70	0.75	0.03	78.90	0.80	0.03	30.40
16	CTF173/13	0.93	0.00	1.10				0.70	0.05	129.80	0.78	0.04	38.60
17	CTF174/38				0.97	0.00	0.50	0.73	0.04	93.50	0.92	0.00	3.40
18	CTF175/14	0.90	0.00	3.90							0.83	0.02	20.00
19	CTF176115	0.92	0.00	2.10									

continuação da tabela 6													
20	CTF177/16				0.88	0.01	18.40	0.89	0.00	6.60	0.90	0.01	5.20
21	CTF178117				0.92	0.00	7.40	0.91	0.00	3.60	0.82	0.02	22.80
22	CTF180/39	0.90	0.00	3.60									
23	CTF181/40												
24	CTF182/41	0.83	0.01	19.20									
25	CTF183/42	0.76	0.03	45.70	0.84	0.02	35.60				0.85	0.02	15.80
26	CTF184/43				0.82	0.02	47.70				0.78	0.04	39.30
27	CTF185/44				0.88	0.01	17.70						
28	CTF186/45	0.73	0.04	65.10							0.82	0.02	21.70
29	CTF187/46	0.87	0.00	7.70				0.75	0.03	76.50	0.75	0.05	51.00
30	CTF188/47				0.80	0.03	61.90				0.82	0.03	24.60
31	CTF189/48	0.84	0.01	16.00	0.80	0.03	64.20	0.73	0.04	97.90	0.79	0.03	32.50
32	CTF190/49	0.74	0.04	60.70	0.89	0.01	13.90						
33	CTF191/50	0.83	0.01	19.30				0.87	0.01	12.50	0.82	0.02	23.20
34	CTF192/51										0.87	0.01	10.10
35	CTF193/52				0.79	0.04	70.20	0.85	0.01	19.30	0.86	0.01	12.70
36	CTF194/53	0.85	0.01	12.50				0.81	0.02	36.70	0.88	0.01	9.50
37	CTF195/54				0.87	0.01	19.90				0.86	0.01	11.70
38	CTF196/55												
39	CTF197/56				0.81	0.03	52.20	0.72	0.05	112.50			
40	CTF199/57	0.81	0.02	25.80									
41	CTF200/58							0.76	0.03	66.10			
42	CTF201/59	0.75	0.03	54.90	0.82	0.02	46.30	0.73	0.04	93.70	0.78	0.04	38.30
43	CTF202/60				0.84	0.02	36.60						
44	CTF203/61	0.78	0.02	36.70	0.78	0.04	73.80				0.82	0.02	23.60
45	CTF204/62							0.86	0.01	16.30			
46	CTF205/63				0.87	0.01	21.10						
47	CTF206/64				0.87	0.01	21.70				0.87	0.01	11.10
48	CTF207/65				0.79	0.03	68.40	0.77	0.02	58.90	0.83	0.02	18.90
49	CTF208/66	0.83	0.01	16.80									
50	CTF209/67	0.78	0.02	38.50	0.85	0.02	30.60				0.80	0.03	30.80
51	CTF210/68							0.87	0.00	10.90			
52	CTF211/69	0.72	0.05	76.80	0.83	0.02	43.90				0.88	0.01	8.40
53	CTF212/70	0.72	0.04	71.60				0.74	0.04	87.50	0.82	0.02	23.80
54	CTF213/11	0.83	0.01	18.30				0.71	0.05	122.70			
55	CTF214/72												
56	CTF215/73				0.90	0.01	11.90				0.80	0.03	29.40
57	CTF216/74				0.87	0.01	23.10						
58	CTF217/75	0.86	0.01	9.90									
59	CTF218/76				0.88	0.01	17.30						
60	CTF219/77										0.83	0.02	19.50
61	CTF220/78							0.90	0.00	6.50			
62	CTF221/79				0.83	0.02	43.20						
63	CTF222/80				0.78	0.04	80.50	0.82	0.01	29.80			
64	CTF223/81	0.84	0.01	14.30	0.85	0.02	29.60				0.89	0.01	7.40
65	CTF224/82	0.70	0.05	89.90	0.83	0.02	43.50						
66	CTF225/83	0.87	0.01	8.70	0.84	0.02	36.50				0.77	0.04	41.20
67	CTF226/84	0.73	0.04	70.00				0.77	0.03	62.20	0.81	0.03	27.90
68	CTF227/85										0.80	0.03	31.40
69	CTF229/86				0.87	0.01	23.40						
70	CTF230/87	0.83	0.01	18.20				0.87	0.01	12.50	0.84	0.02	18.30
71	CTF231/88										0.81	0.03	25.10
72	CTF232/89				0.82	0.02	48.10	0.71	0.05	114.50			

continuação da tabela 6													
73	CTF233/90	0.82	0.01	22.40									
74	CTF234/91							0.78	0.02	51.70	0.87	0.01	9.70
75	CTF235/92				0.88	0.01	18.70				0.72	0.07	64.00
76	CTF236/93				0.89	0.01	15.60				0.81	0.03	27.10
77	CTF237/94	0.88	0.00	6.70	0.78	0.04	73.20				0.85	0.02	15.40
78	CTF238/95										0.81	0.03	27.80
79	CTF239/96										0.87	0.01	10.60

Correlação entre o nível de expressão do RNA e comprimento da fibra

Tabela 6: A correlação entre o nível de expressão do RNA de 79 genes e comprimento da fibra é apresentada para a média e os três pontos de tempo (5 dpa, 10 dpa e 15 dpa) usando o coeficiente de correlação de Pearson (R) e os valores p. A eficiência (E) da reação de ampliação também é apresentada.

Os 79 genes fornecidos na Tabela 6 acima atendem os critérios de seleção dos valores quadrados R superiores a 0,8 e P < 0,05. (R e P foram calculados de acordo com a correlação de Pearson) [Protocolo de Transferência Hipertexto (http)://davidmlane (ponto) com/hyperstat/A34739 (ponto) html).

De modo geral, 96 genes de algodão (os 17 genes foram descritos nos Exemplos 2 e 3, e os 79 genes descritos no Exemplo 4) foram identificados aqui como envolvidos no desenvolvimento de fibra de algodão. Além disso, 33 genes (SEQ ID N°s:97-129) foram identificados de outra espécie de planta, compartilhando características comuns e homologia de seqüência de um ou mais genes do algodão. No total, 129 genes foram identificados usando a

ferramenta de bioinformática e estudos de expressão no presente estudo como sendo capazes de positivamente afetar o crescimento e alongamento de célula, bem como as características da fibra de algodão. Os genes identificados são resumidos na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7

Resumo dos genes afetando o crescimento e alongamento de célula e características da fibra de algodão

Nº de Série	Nome do Gene	Nome do Agrupamento	Organismo	Polinucleotídeo SEQ ID Nº:	Polipeptídio SEQ ID Nº:
1	CTF165	AI054735	algodão	1	130
2	CTF167	AI725458	algodão	2	131
3	CTF101	AI729321	algodão	3	132
4	CTF11O	AI725814	algodão	4	133
5	CTF111	TG AI726275	algodão	5	134
6	CTF113	AI727515	algodão	6	135
7	CTF124	AI726129	algodão	7	136
8	CTF135	AI727537	algodão	8	137
9	CTF162	C0117674	algodão	9	138
10	CTF166	C0095695	algodão	10	139
11	CTF169	AI725762	algodão	11	140
12	CTFI72	AW186826	algodão	12	141
13	CTF173	AI730906	algodão	13	142
14	CTF175	AW187393	algodão	14	143
15	CTF176	BE053309	algodão	15	144
16	CTFI77	BF269648	algodão	16	145
17	CTF178	BF271992	algodão	17	146
18	CTF121	AI731653	algodão	18	147
19	CTF126	BF275672	algodão	19	148
20	CTF130	AI725540	algodão	20	149
21	CTF131	AI725631	algodão	21	150
22	CTF132	AI726672	algodão	22	151
23	CTF133	AI725569	algodão	23	152
24	CTF134	BQ404679	algodão	24	153
25	CTF144	AI726469	algodão	25	154
26	CTF146	AI730537	algodão	26	155
27	CTF150	AI725910	algodão	27	156
28	CTF155	CA992741	algodão	28	157
29	CTF157	BQ405530	algodão	29	158
30	CTF158	C0071210	algodão	30	159
31	CTF159	C0096649	algodão	31	160
32	CTF161	COI02097	algodão	32	161
33	CTF163	AW187222	algodão	33	162
34	CTF164	DV849461	algodão	34	163
35	CTF168	AI725617	algodão	35	164
36	CTF170	AI727242	algodão	36	165
37	CTF171	AI727506	algodão	37	166
38	CTF174	AW186645	algodão	38	167
39	CTF180	BG440663	algodão	39	168
40	CTF181	BF276183	algodão	40	169
41	CTF182	BQ402540	algodão	41	170
42	CTF183	BQ404247	algodão	42	171
43	CTF184	BQ408268	algodão	43	172

continuação da tabela 7					
44	CTF185	BQ410590	algodão	44	173
45	CIF186	BQ412432	algodão	45	174
46	CTF187	C0080116	algodão	46	175
48	CTF189	C0087969	algodão	48	177
49	CTF190	COI08798	algodão	49	178
50	CTF191	CO109429	algodão	50	179
51	CTFI92	C0121056	algodão	51	180
52	CTF193	C0493025	algodão	52	181
53	CTF194	DN758069	algodão	53	182
54	CTF195	DT459383	algodão	54	183
55	CTF196	DT555914	algodão	55	184
56	CTF197	DT564706	algodão	56	185
57	CTF199	AI054474	algodão	57	186
58	CTF200	AI054549	algodão	58	187
59	CTF201	AI055034	algodão	59	188
60	CTF202	AI725366	algodão	60	189
61	CTF203	AI725561	algodão	61	190
62	CTF204	AI725564	algodão	62	191
63	CTF205	AI725800	algodão	63	192
64	CTF206	AI725842	algodão	64	193
65	CTF207	AI725955	algodão	65	194
66	CTF208	AI726722	algodão	66	195
67	CTF209	AI726995	algodão	67	196
68	CTF210	AI727277	algodão	68	197
69	CTF211	DR457681	algodão	69	198
70	CTF212	AI727568	algodão	70	199
71	CTF213	AI727795	algodão	71	200
72	CTF214	BF 269744	algodão	72	201
73	CTF215	AI729467	algodão	73	202
74	CTF216	AI729616	algodão	74	203
75	CTF217	AI730004	algodão	75	204
76	CTF218	AI730197	algodão	76	205
77	CTF219	AI730262	algodão	77	206
78	CTF220	AI730418	algodão	78	207
79	CTF221	AI730490	algodão	79	208
80	CTF222	AI730776	algodão	80	209
81	CTF223	AI731861	algodão	81	210
82	CTF224	AW186914	algodão	82	211
83	CTF225	AW187127	algodão	83	212
84	CTF226	BE052628	algodão	84	213
85	CTF227	BE053126	algodão	85	214
86	CTF229	BF272961	algodão	86	215
87	CTF230	BF274664	algodão	87	216
88	CTF231	BF274983	algodão	88	217
89	CTF232	BF275498	algodão	89	218
90	CTF233	BF276821	algodão	90	219
91	CTF234	BG440416	algodão	91	220
92	CTF235	BG440584	algodão	92	221
93	CTF236	BG442540	algodão	93	222
94	CTF237	BG443240	algodão	94	223
95	CTF238	BG447110	algodão	95	224
96	CTF239	C0070299	algodão	96	225
97		DYOO0718	canola	97	226
98		MDL28470M000422	mamona	98	227
99		CV263160	álamo	99	228
100		CA013415	cevada	100	229
101		CD820239	canola	101	230
102		AW222076	tomate	102	231
103		MDL28708M000182	mamona	103	232
104		BIL29045	álamo	104	233
105		AI773326	tomate	105	234

continuação da tabela 7					
106		EG658665	mamona	106	235
107		BP923230	álamo	107	236
108		CN520627	álamo	108	237
109		BQ468862	cevada	109	238
110		MDL29933M00 1398	mamona	110	239
111		CV228068	álamo	111	240
112		CD208850	sorgo	112	241
113		NYOO5814	canola	113	242
114		MDL29637M000752	mamona	114	243
115		AI161767	álamo	115	244
116		BGL31373	tomate	116	245
117		EG697134	mamona	117	246
118		BG125154	tomate	118	247
119		MDL2980611000954	álamo	119	248
120		BI124474	álamo	120	249
121		BU831288	álamo	121	250
122		AW039858	tomate	122	251
123		EG664483	mamona	123	252
124		BI127105	álamo	124	253
125		BU893422	álamo	125	254
126		CD822731	canola	126	255
127		DY029904	b_oleracea	127	256
128		AW441747	tomate	128	257
129		MDL2970611001328	mamona	129	258

Tabela 7: Resumo dos genes afetando o crescimento e alongamento de célula e características da fibra de algodão

Os polipeptídios com homologia significativa aos genes identificados de aprimoramento da fibra de algodão, que são esperados para servir a mesma função que os genes identificados, foram identificados a partir dos bancos de dados usando o software BLAST (Tabela 8).

Tabela 8

Polipeptídios significativamente homólogos aos genes de aprimoramento do algodão

Nucleotídeo SEQ ID Nº:	Nome do agrupamento	Organismo	Polipeptídeo SEQ ID Nº:	Homologia à SEQ ID Nº:	% de Identidade	Algoritmo
259	AU223627_T1	maça	536	148	86	tblastn
260	AU223627_T2	maça	537	148	86	tblastn
261	CN444690_T1	maça	538	186	89	tblastn
262	CN488685_T1	maça	539	152	92	tblastn
263	CN488848_T1	maça	540	148	86	tblastn
264	CN579093_T1	maça	541	152	91	tblastn
265	CN945045_T1	maça	542	186	89	tblastn
266	C0416177_T1	maça	543	187	89	tblastn
267	CV044307_T1	damasco	544	148	90	tblastn
268	CV044352_T1	damasco	545	148	91	tblastn
269	DR920252_T1	aquilegia	546	224	87	tblastn

Continuação da Tabela 8						
270	DR930905_T1	aquilegia	547	186	88	tblastn
271	DR941117_T1	aquilegia	548	184	91	tblastn
272	AT1G21720_T1	arabidopsis	549	152	90	tblastn
273	AT1G77440_T1	arabidopsis	550	152	90	tblastn
274	AT3G07410_T1	arabidopsis	551	230	91	tblastn
275	AT3G46000_T1	arabidopsis	552	148	85	tblastn
276	AT3G46010_T1	arabidopsis	553	148	86	tblastn
277	AT3G46010_T2	arabidopsis	553	148	86	tblastn
278	AT3G46010_T3	arabidopsis	554	148	86	tblastn
279	AT3G46010_T4	arabidopsis	554	148	86	tblastn
280	AT4G18800_T1	arabidopsis	555	186	88	tblastn
281	AT5G04040_T1	arabidopsis	556	226	93	tblastn
282	AT5G45750_T1	arabidopsis	557	186	89	tblastn
283	AT5G59890_T1	arabidopsis	558	148	85	tblastn
284	AM061591_T1	b_oleracea	559	148	89	tblastn
285	DY013953_T1	b_oleracea	560	148	90	tblastn
286	DY026130_T1	b_oleracea	561	148	85	tblastn
287	DY026624_T1	b_oleracea	562	148	89	tblastn
288	DY027267_T1	b_oleracea	563	148	85	tblastn
289	DY027503_T1	b_oleracea	564	148	90	tblastn
290	DY027503_T2	b_oleracea	564	148	90	tblastn
291	DY027857_T1	b_oleracea	565	152	90	tblastn
292	DY028163_T1	b_rapa	566	148	85	tblastn
293	BG543077_T1	b_rapa	567	148	85	tblastn
294	BG543272_T1	b_rapa	568	148	90	tblastn
295	BG544963_T1	b_rapa	569	148	90	tblastn
296	BQ790771_T1	b_rapa	570	242	98	tblastn
297	C0749582_T1	b_rapa	571	148	89	tblastn
298	CX272524_T1	b_rapa	572	148	85	tblastn
299	L38533_T1	banana	573	230	94	tblastn
300	DN239338_T1	banana	574	148	87	tblastn
301	ES432595_T1	cevada	575	152	87	tblastn
302	AL501359_T1	cevada	576	152	85	tblastn
303	AL509680_T1	basilicum	577	152	85	tblastn
304	DY324442_T1	canola	578	152	90	tblastn
305	CD811679_T1	canola	579	148	90	tblastn
306	CD812137_T1	canola	580	148	85	tblastn
307	CD812887_T1	canola	581	148	85	tblastn
308	CD814124_T1	canola	582	148	90	tblastn
309	CD814355_T1	canola	583	148	85	tblastn
310	CD818629_T1	canola	584	148	85	tblastn
311	CD818688_T1	canola	585	148	90	tblastn
312	CD819087_T1	canola	586	148	89	tblastn
313	CD819123_T1	canola	587	152	90	tblastn
314	CD821129_T1	canola	588	148	89	tblastn
315	CD824095_T1	canola	589	148	89	tblastn
316	CD824392_T1	canola	590	152	89	tblastn
317	CD829819_T1	canola	591	148	85	tblastn
318	CN727283_T1	canola	592	148	85	tblastn
319	CN729295_T1	canola	593	148	85	tblastn
320	CN737714_T1	canola	594	152	90	tblastn
321	DY007433_T1	canola	595	186	86	tblastn
322	DY0I1922_T1	canola	596	152	88	tblastn
323	DY020991_T1	canola	597	186	86	tblastn
324	EE454178_T1	canola	598	152	89	tblastn
325	H07822_T1	mamona	599	148	90	tblastn
326	EE255551_T1	mamona	600	148	94	tblastn
327	EE258555_T1	mamona	601	224	88	tblastn
328	EE258555_T2	mamona	602	224	88	tblastn
329	EE259859_T1	mamona	603	152	92	tblastn
330	EG662102_T1	mamona	604	186	95	tblastn

Continuação da Tabela 8						
331	MDL28966M000533_T1	mamona	605	184	91	tblastn
332	MDL29646M001115_T1	mamona	606	139	85	tblastn
333	T14887_T1	cereja	607	148	88	tblastn
334	EE488259_T1	citrus	608	148	85	tblastn
335	BQ623399_T1	citrus	609	148	91	tblastn
336	BQ624187_T1	citrus	610	152	92	tblastn
337	BQ624753_T1	citrus	611	148	92	tblastn
338	CB291434_T1	citrus	612	186	94	tblastn
339	CF505092_T1	citrus	613	224	89	tblastn
340	CF505190_T1	citrus	614	148	92	tblastn
341	CF833473_T1	citrus	615	152	92	tblastn
342	CF838037_T1	citrus	616	187	91	tblastn
343	DY261108_T1	coffea	617	173	86	tblastn
344	DV667368_T1	coffea	618	148	93	tblastn
345	DV667647_T1	coffea	619	148	93	tblastn
346	DV668122_T1	coffea	620	231	90	tblastn
347	DV671720_T1	coffea	621	148	87	tblastn
348	DV673964_T1	coffea	622	152	94	tblastn
349	DV684181_T1	algodão	623	186	91	tblastn
350	AI725473_T1	algodão	624	187	89	tblastn
351	AI725715_T1	algodão	625	186	96	tblastn
352	AI725715_T2	algodão	626	186	96	tblastn
353	AI725715_T3	algodão	627	186	98	tblastn
354	AI726232_T1	algodão	628	186	95	tblastn
355	AI726275_T1	algodão	629	134	99	tblastn
356	AI726544_T1	algodão	630	148	89	tblastn
357	AI726815_T1	algodão	631	148	90	tblastn
358	AI726907_T1	algodão	632	147	97	tblastn
359	AI727140_T1	algodão	633	148	97	tblastn
360	AI727282_T1	algodão	634	155	97	tblastn
361	AI727959_T1	algodão	635	148	100	tblastn
362	AI728713_T1	algodão	636	148	93	tblastn
363	AI730512_T1	algodão	637	157	96	tblastn
364	AI731512_T1	algodão	638	184	95	tblastn
365	AI731769_T1	algodão	639	152	97	tblastn
366	AI732019_T1	algodão	640	137	97	tblastn
367	AW186735_T1	algodão	641	224	92	tblastn
368	BE051989_T1	algodão	642	157	97	tblastn
369	BE053515_T1	algodão	643	148	90	tblastn
370	BG441743_T1	algodão	644	139	85	tblastn
371	BG445675_T1	algodão	645	153	97	tblastn
372	BQ404948_T1	algodão	646	184	97	tblastn
373	C0076074_T2	algodão	647	225	88	tblastn
374	C0090129_T1	algodão	648	148	89	tblastn
375	CO107228_T1	algodão	649	160	90	tblastn
376	CO117171_T1	algodão	650	148	92	tblastn
377	DT563255_T1	algodão	651	186	94	tblastn
378	DW495789_T1	linho	652	149	96	tblastn
379	CV478457_T1	uva	653	148	89	tblastn
380	BM436339_T1	uva	654	148	95	tblastn
381	BM436339_T2	uva	654	148	95	tblastn
382	BQ794373_T1	uva	655	173	85	tblastn
383	BQ796448_T1	uva	656	148	94	tblastn
384	BQ796444_T2	uva	656	148	94	tblastn
385	BQ796638_T1	uva	657	152	93	tblastn
386	BQ797077_T1	uva	658	148	93	tblastn
387	BQ797077_T2	uva	658	148	93	tblastn
388	BQ797077_T3	uva	658	148	93	tblastn
389	BQ797077_T4	uva	658	148	93	tblastn
390	CB035843_T1	uva	659	224	88	tblastn
391	CB911305_T1	uva	660	186	93	tblastn

Continuação da Tabela 8						
392	CB916297_T1	uva	661	184	91	tblastn
393	CF373264_T1	uva	662	186	86	tblastn
394	CN545526_T1	uva	663	139	85	tblastn
395	EE106378_T1	ipomeia	664	132	86	tblastn
396	BJ554624_T1	ipomeia	665	148	92	tblastn
397	BJ555556_T1	ipomeia	666	139	86	tblastn
398	BJ556366_T1	ipomeia	667	152	92	tblastn
399	BJ556502_T1	ipomeia	668	186	88	tblastn
400	BJ559892_T1	ipomeia	669	148	94	tblastn
401	BJ563588_T1	ipomeia	670	224	88	tblastn
402	CB330087_T1	ipomeia	671	173	85	tblastn
403	CJ738141_T1	ipomeia	672	231	91	tblastn
404	EE875053_T1	alface	673	148	94	tblastn
405	DW043786_T1	alface	674	148	87	tblastn
406	DW049988_T1	alface	675	224	86	tblastn
407	DW052597_T1	alface	676	148	87	tblastn
408	DW052758_T1	alface	677	152	90	tblastn
409	DW053430_T1	alface	678	152	92	tblastn
410	DW053430_T2	alface	678	152	92	tblastn
411	DW074782_T1	alface	679	148	86	tblastn
412	DW081477_T1	alface	680	152	91	tblastn
413	DW081477_T2	alface	680	152	91	tblastn
414	DW084530_T1	alface	681	148	86	tblastn
415	DW135542_T1	lótus	682	152	92	tblastn
416	BG662283_T1	lótus	683	152	92	tblastn
417	BI417319_T1	milho	684	152	93	tblastn
418	AI586912_T1	milho	685	152	85	tblastn
419	A1714711_T1	milho	686	152	87	tblastn
420	AI920333_T1	milho	687	184	91	tblastn
421	AW054435_T1	milho	688	152	85	tblastn
422	AW056991_T1	milho	689	152	85	tblastn
423	BM500177_T1	milho	690	186	86	tblastn
424	CD945757_T1	milho	691	186	86	tblastn
425	DQ245781_T1	milho	692	148	85	tblastn
426	DQ245820_T1	medicago	693	148	85	tblastn
427	AA661031_T1	medicago	694	186	85	tblastn
428	AL370167_T1	medicago	695	152	89	tblastn
429	AW686071_T1	medicago	696	148	86	tblastn
430	AW687059_T1	medicago	697	152	92	tblastn
431	BE205479_T1	pêssego	698	132	86	tblastn
432	AJ827186_T1	pêssego	699	148	90	tblastn
433	AJ827260_T1	pêssego	700	148	91	tblastn
434	AJ872529_T1	pêssego	701	152	92	tblastn
435	BU039190_T1	amendoim	702	148	85	tblastn
436	CD037927_T1	amendoim	703	148	94	tblastn
437	CX018158_T1	pimenta	704	152	95	tblastn
438	BM064776_T1	pimenta	705	152	90	tblastn
439	CA523467_T1	petúnia	706	148	91	tblastn
440	AF183903_T1	petúnia	707	148	89	tblastn
441	AF183904_T1	petúnia	708	148	92	tblastn
442	DW177184_T1	abacaxi	709	139	87	tblastn
443	C0730856_T1	abacaxi	710	148	88	tblastn
444	C0731353_T1	abacaxi	711	148	87	tblastn
445	C0731804_T1	abacaxi	712	186	89	tblastn
446	DT338785_T1	pinho	713	148	89	tblastn
447	AA739732_T1	pinho	714	152	87	tblastn
448	C0363003_T1	álamo	715	152	87	tb1astn
449	AI161898_T1	álamo	716	148	94	tblastn
450	AI161898_T2	álamo	717	148	93	tblastn
451	AII61898_T3	álamo	718	148	94	tblastn
452	AI161961_T1	álamo	719	148	94	tblastn

Continuação da Tabela 8						
453	AI161961_T2	álamo	719	148	94	tblastn
454	AI161961_T3	álamo	720	148	92	tblastn
455	AI161961_T4	álamo	720	148	92	tblastn
456	AI162478_T1	álamo	721	152	87	tblastn
457	AI162845_T1	álamo	722	186	94	tblastn
458	BI122785_T1	álamo	723	148	90	tblastn
459	BU813699_T1	álamo	724	148	89	tblastn
460	BU813699_T2	álamo	724	148	89	tblastn
461	BU836906_T1	álamo	725	186	93	tblastn
462	BU875572_T1	álamo	726	139	85	tblastn
463	BU875572_T2	álamo	726	139	85	tblastn
464	CV228249_T1	álamo	727	224	88	tblastn
465	CV237204_T1	álamo	728	152	86	tblastn
466	CV237204_T2	batata	728	152	86	tblastn
467	BE344367_T1	batata	729	148	91	tblastn
468	BG593676_T1	batata	730	245	89	tblastn
469	BG597337_T1	batata	731	148	90	tblastn
470	BG598410_T1	batata	732	247	97	tblastn
471	BG598410_T2	batata	733	247	97	tblastn
472	BG888799_T1	batata	734	152	88	tblastn
473	BQ118661_T1	batata	735	139	85	tblastn
474	BQ118661_T2 -	batata	736	139	85	tblastn
475	BQ516531_T1	batata	737	148	91	tblastn
476	CK851382_T1	batata	738	148	91	tblastn
477	CN212590_T1	batata	739	251	93	tblastn
478	CN212590_T2	arroz	739	251	93	tblastn
479	AF327517_T1	arroz	740	186	86	tblastn
480	BI118688_T1	arroz	741	152	85	tblastn
481	BI795939_T1	arroz	742	148	85	tblastn
482	U38037_T1	arroz	743	152	85	tblastn
483	U38037_T2	rosa	743	152	85	tblastn
484	BQI04946_T1	rosa	744	148	92	tblastn
485	EC586289_T1	sésamo	745	186	89	tblastn
486	EC588463_T1	sorgo	746	148	88	tblastn
487	BU669008_T1	sorgo	747	148	94	tblastn
488	AW285608_T1	sorgo	748	152	86	tblastn
489	BE592644_T1	soja	749	152	87	tblastn
490	BE595956_T1	soja	750	184	91	tblastn
491	AW349054_T1	soja	751	186	86	tblastn
492	AW349285_T1	soja	752	148	87	tblastn
493	AW349636_T1	soja	753	152	92	tblastn
494	AW569132_T1	soja	754	152	92	tblastn
495	BE352761_T1	soja	755	187	89	tblastn
496	BE659353_T1	soja	756	139	85	tblastn
497	BE659353_T2	soja	756	139	85	tblastn
498	BE661354_T1	soja	757	148	89	tblastn
499	BI969429_T1	soja	758	152	93	tblastn
500	BI971168_T1	abeto	759	148	88	tblastn
501	CA852085_T1	abeto	760	186	86	tblastn
502	CD390653_T1	cana-de-açúcar	761	148	93	tblastn
503	AF051246_T1	cana-de-açúcar	762	152	87	tblastn
504	AF051246_T2	cana-de-açúcar	762	152	87	tblastn
505	CA069331_T1	girassol	763	152	87	tblastn
506	CA106361_T1	girassol	764	152	86	tblastn
507	CA118153_T1	girassol	765	186	86	tblastn
508	CD851311_T1	girassol	766	152	90	tblastn
509	CD851311_T2	thellungiella	766	152	90	tblastn
510	CX943625_T1	tabaco	767	148	85	tblastn

Continuação da Tabela 8						
511	DY914967_T1	tabaco	768	152	90	tblastn
512	DN772748_T1	tabaco	769	148	89	tblastn
513	BP130889_T1	tabaco	770	247	86	tblastn
514	BP136053_T1	tabaco	771	152	89	tblastn
515	BP136053_T2	tabaco	771	152	89	tblastn
516	CV017679_T1	tabaco	772	148	90	tblastn
517	CV017893_T1	tabaco	773	148	92	tblastn
518	CV019967_T1	tabaco	774	148	90	tblastn
519	CV020081_T1	tabaco	775	224	86	tblastn
520	CV021812_T1	tomate	776	148	89	tblastn
521	EB424751_T1	tomate	777	148	87	tblastn
522	EB426768_T1	tomate	778	148	92	tblastn
523	BG124262_T1	tomate	779	148	90	tblastn
524	BG126286_T1	tomate	780	148	91	tblastn
525	BG127143_T1	tomate	781	152	88	tblastn
526	BG133022_T1	trigo	782	224	86	tblastn
527	BG629194_T1	trigo	783	148	89	tblastn
528	BG643389_T1	trigo	784	186	88	tblastn
529	BE398818_T1	trigo	785	152	86	tblastn
530	BE403180_T1	trigo	786	152	85	tblastn
531	BE490465_T1	trigo	787	152	85	tblastn
532	BF202079_T1	trigo	788	186	86	tblastn
533	BF484998_T1	trigo	789	229	93	tblastn
534	BQ806763_T1	trigo	790	152	85	tblastn
535	CA610895_T1	trigo	791	152	86	tblastn

Tabela 8: Polipeptídios significativamente homólogos aos genes de aprimoramento do algodão.

EXEMPLO 5

CLONAGEM DOS GENES SELECIONADOS EM UM VETOR BINÁRIO SOB REGULAÇÃO CONSTITUTIVA E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DOS MESMOS

Análise Bioinformática

Análise de Estrutura de Leitura Aberta (ORF) - As seqüências de gene do presente estudo foram analisadas para ORFs usando o software Gene Runner versão 3.05 [Hasting Software, Inc: World Wide Web (ponto) generunner (ponto) com/}. Os ORFs de cada gene foram comparados ao banco de dados Genbank, usando o Blast [World Wide Web (ponto) ncbi (ponto) nlm (ponto) nih (ponto) gov/BLAST/]. Ao comparar os ORFs homólogos mais altos, a posição do códon de iniciação de ATG foi determinada. Todas as seqüências aqui descritas foram demonstradas como tendo

um ORF previsto de comprimento total e incluindo o códon previsto de início de ATG.

Procedimentos Experimentais e Resultados

Clonagem no vetor de expressão pPI/pGI - Para clonar os genes do presente estudo, os RNAs totais de diversas etapas de desenvolvimento das células que produzem fibra foram extraídos, usando a Extração de RNA de Borato Quente do Tecido de Algodão cultivado em Rehovot, Israel, de acordo com World Wide Web (ponto) eeob (ponto) iastate (ponto) edu/faculty/WendelJ/rnaextraction (ponto) html. As moléculas complementares de DNA (cDNA) foram produzidas a partir do mRNA usando a enzima (Roche) de transcriptase reversa M-MuLV (RT) e primer de DNA T16NN, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A ampliação do cDNA foi realizada para 19 genes, a partir das seqüências abaixo, isto é, clones de CTF: CTF101, CTF110, CTF111, CTF113, CTF124, CTF132, CTF135, CTF162, CTF165, CTF166, CTFT67, CTF169, CTF171, CTF172, CTF173, CTF175, CTF176, CTF177 e CTF178 (SEQ ID N°s:1-17, 22 e 37; Tabela 7 abaixo) por PCR usando enzima de polimerase de DNA de revisão de PFU [Promega, World Wide Web (ponto) promega (ponto) com/pnotes/68/7381_07/7381_07 (ponto) html] seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os primers para cada gene foram projetados para expandir todo o ORF. Os locais adicionais de endonuclease de restrição foram adicionados na extremidade 5′ de cada primer para facilitar ainda a clonagem dos CTFs ao vetor binário (pPI). A Tabela 9 abaixo lista os primers usados para clonagem de cada um dos genes

Tabela 9

Primers usados para clonar cada um dos genes

CTF Nº	Primer Dianteiro / SEQ ID Nº:	Primer Reverso / SEQ ID Nº:	Local de restrição a montante	Local de restrição a jusante
CTF101	CACCCGGGACCACCATC AAACCACATCC/801	GAGAGCTCTCCAAAATTGACACACCAG G/802	Sma	Sac
CTF110	AACCCGGGTTCCCTTTCC AAGCTTCAGC/803	CACCCGGGTACCTAAAGTTG CAGCTTGC/804	Sma	Sma
CTF111	TTCCCGGGTTGCCTTTTT GTCATTTCCC/805	CAGAGCTCTTGTTTATGAATC CACTTTGGG/806	Sma	Sac
CTF113	GACCCGGGAAACGATGG AGGATCTTGCC/807	CAGAGCTCTTGGAATTGAAATGTCATT ACAGAG/808	Sma	Sac
CTF124	TTCCCGGGCACTCTTCAT TCCTCACCTACTC/809	TTGAGCTCTGGATTTCTGAAAACAACC G/810	Sma	Sac
CTF132	AACCCGGGCACCACCTC CACTCACCTTC/811	TTGAGCTCTGCTCTTATATCA TGTGAAGGC/812	Sma	Sac
CTF135	CACCCGGGAACTCTTCA AGACCATTCGAC/813	ACGAGCTCAGCTAGATAAATCACAACC ATCC/814	Sma	Sac
CTF162	TGCCCGGGTTCAGCGTT CGAATCCATG/815	GTGAGCTCTGCCTGACACATTGACATG C/816	Sma	Sac
CTF165	CTCCCGGGTTTGAAGCT CAGGAACTAATGG/817	TTGAGCTCAGGGACCAATTT GTTGCCA/818	Sma	Sac
CTF166	ACGATATCAAGAATCCG ACCCGGTAAC/819	CTGAGCTCGGAAGTAAATTT GGACACTCG/820	EcoRV	Sac
CTF167	AACCCGGGCCCTAAGAT GACAAACCAAGA/821	TGGAGCTCAATAATCATGTG GCAGTAGTTTG/822	Sma	Sac
CTF169	GACCCGGGAAACATGGA AGGAGACGATG/823	CGGAGCTCAAAAGCATTCAGAACAACC AG/824	Sma	Sac
CTF171	AGCCCGGGAAACATGTT TGCAGGAGATCAG/825	AGGAGCTCAATTACAACCAAAGGTTAA CCC/826	Sma	Sac
CTF172	ACCCCGGGGAGCTCTGG ATACAGTTAAGAATC/827	CTCCCGGGTAGACTTGTAGT AAAGCATGTATCC/828	Sma	Sma
CTF173	ATCCCGGGAGTTAACTG GTCTCTTCTGATGTC/829	TCGAGCTCAACAACTATACC AGTCATTGCTTC/830	Sma	Sac
CTF175	AGGATATCTTTCGATCA CCGTGATGGC/831	GCGAGCTCGTAGTGACGTCACCGGTT C/832	EcoRV	Sac
CTF176	GACCCGGGAGACACACA AAGCGAGAAGG/835	AAGAGCTCTATCACTTACATCCTAGGC AGC/834	Sma	Sac
CTF177	TTCCCGGGTCTGGCTTG AAAATGGTGTG/833	AAGAGCTCGCATTGAACTTC ATCATCTGTAAG/836	Sma	Sac
CTF178	CGCCCGGGTTTTTCCAA CTAAGGTTAGGC/837	CACCCGGGCCAATAAACAATAGCACTG C/838	Sma	Sma

Os produtos resultantes de enfraquecimento por PCR foram purificados usando o Kit de Purificação PCR (Qiagen, Alemanha), digeridos com os endonucleases apropriados de restrição (Roche) e clonados no vetor binário pPI ou pGI (Figura 1), enquanto substitui o gene repórter GUS existente. pPI é uma versão modificada do

pBI101.3 (Clontech, Acessão N° U12640). pPI foi construído ao inserir uma seqüência de sinal poli-(A) sintética, que originou-se do vetor de plasmídio Básico de pGL3 (Promega, GenBank Acessão N° U47295, em que a seqüência de sinal de poli-(A) sintética está localizada entre os nucleotídeos 4658-4811), no local de restrição HindIII de pBI101.3 [enquanto reconstituindo o local HindIII, a jusante à inserção de poli-(A)], para evitar a possibilidade do efeito de leitura completa a montante do promotor Nos. Em alguns casos, o plasmídio binário principal usado foi o pGI que é semelhante ao pPI, porém o gene GUS foi substituído pelo gene GUS-Intrão (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990). Para substituir o gene GUS/GUS-Intrão por outro dos genes CT no vetor binário pPI/pGI, pPI/pGI foi digerido com as enzimas apropriadas de restrição [enzima de restrição de prime 5' é a enzima de restrição de prime SmaI ou XbaI e 3' é SacI ou EcoRV (Roche - usando o protocolo fornecido pelo fabricante)]. O vetor binário aberto foi purificado usando o Kit de Purificação PCR (Qiagen, Alemanha). 5-75 ng do produto de PCR de cada um dos genes CTF e 100 ng do vetor de plasmídio aberto pPI/pGI foi ligado em 10 µL do volume de reação de ligação usando a enzima de ligase do DNA T4 (Roche), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os produtos de ligação foram introduzidos nas células de E. coli.

Expressão recombinante na bactéria - 60 µl de E. coli, células competentes de DH5-a de cepa (cerca de 10^9 células/ml) foram transformadas usando 1

µl da mistura de reação de ligação por eletroporação, usando um eletroporador MicroPulser (Biorad), 0,2 cm de cubetas (Biorad) e programa de eletroporação EC-2 (Biorad). As células de E. coli foram cultivadas em meio líquido LB de 0,8 ml em 37 °C por 1 hora e 0,2 ml da suspensão de célula foram laminadas em lâminas LB-agar complementadas com o antibiótico canamicina de 50 mg/L (Sigma). As lâminas foram então incubadas em 37 °C por 16 horas. As colônias de bactéria foram cultivadas e a expressão foi confirmada por amplificação de PCR usando primers que foram projetados para expandir a sequência inserida no vetor binário. Os primers usados para a amplificação do DNA das inserções no vetor binário pPI foram: 5'-GGTGGCTCCTACAAATGCCATC-3' (dianteiro, SEQ ID N°:839) e 5'-AAGTTGGGTAACGCCAGGGT-3' (reverso, SEQ ID N°:-840).

Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose de 1,5 % e os tamanhos de produto foram estimados ao comparar a escada de DNA (MBI Fermentas). Os produtos de PCR com o tamanho previsto foram sequenciados usando os mesmos primers previamente usados para amplificação de PCR (Vide Tabela 9 acima).

Os primers adicionais, que foram projetados com base na seqüência de cada inserção de gene, foram usados para concluir o sequenciamento da inserção de ORP de comprimento total.

O seqüenciamento da seqüência inserida foi realizado para checar que os clones foram introduzidos na direção correta, e para eliminar a

possibilidade de que os erros de sequência foram incluídos durante a amplificação de PCR. As sequências de DNA foram determinadas usando o seqenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc). As sequências clonadas de cDNA de 17 genes de algodão são fornecidas (SEQ ID N°s: 906-922), bem como suas sequências deduzidas de aminoácido (SEQ ID N°s:923-939). Na maioria dos casos, as alterações de minuto foram averiguadas entre a sequência prevista de forma bioinformática e aquelas clonadas, provavelmente devido às variações de alelo e qualidade de sequência dos ESTs no banco de dados.

Em cada uma das 19 construções binárias de pPI/pGI abrigando os genes CTF, o promotor 35S constitutivo do Vírus Mosaico de Couve-Flor foi clonado.

A seqüência do promotor 35S do Vírus Mosaico de Couve-Flor (SEQ ID N°:841), originada a partir do vetor pBI121 (Clontech, Acessão GenBank N° AF485783) foi clonada ao digerir o vetor de pBI121 com as endonucleases de restrição Hindlll e BamHI (Roche) e ligada nas construções binárias, digeridas com as mesmas enzimas.

EXEMPLO 6

TRANSFORMAÇÃO DE AGROBACTERIUM DOS PLASMÍDIOS BINÁRIOS ABRANGENDO OS GENES DE INTERESSE E EXPRESSÃO NAS PLANTAS DE TOMATE

Em um estudo anterior, os presentes inventores demonstraram o potencial de usar pelo de semente de tomate como um modelo para a fibra de algodão (PCT IL2005/000627). Dessa forma, para demonstrar o efeito

dos genes de aprimoramento da fibra isolados do presente estudo no crescimento da fibra, as plantas de tomate foram transformadas com os vetores binários compreendendo os genes isolados de algodão sob a regulação de transcrição do promotor 35S. Cada uma das dezenove construções binárias, compreendendo o promotor 35S a montante de cada um dos genes de CTFs foi transformada em plantas de tomate via transformação de Agrobacterium tumefacience, conforme segue.

Procedimentos Experimentais e Resultados

Transformação das construções binárias compreendendo o promotor 35S a montante dos genes CTF em plantas de tomate via Agrobacterium tumefacience - 60 µl das células competentes de GV301 ou LB4404 de Agrobacterium tumefaciens (cerca de 10^9 células/ml) foram transformados com 20 ng do plasmídio binário via eletroporação, usando um eletroporador MicroPulser (Biorad), 0,2 cm de cubetas (Biorad) e programa de eletroporação EC-2 (Biorad).

As células de Agrobacterium foram cultivadas em meio líquido LB de 0,8 ml em 28 °C por 3 horas e 0,2 ml da suspensão de célula foi laminado em lâminas de LB-agar complementadas com o antibiótico gentamicina de 50 mg/L (para cepas de Agrobacterium GV301) ou estreptomicina de 300 mg/L (para a cepa de Agrobacterium LB4404) e canamicina de 50 mg/L (Sigma). As lâminas foram então incubadas em 28 °C por 48 horas. As colônias de Agrobacterium foram cultivadas e a amplificação de PCR foi realizada nas células de Agrobacterium, usando os primers

que foram projetados para expandir a sequência inserida no vetor binário.

Os primers usados para amplificação de PCR foram: 5'-GGTGGCTCCTACAAATGCCATC-3' (dianteiro, SEQ ID N°:839) e 5'-AAGTTGGGTAACGCCAGGGT-3' (reverso, SEQ ID N°:840).

Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose de 1,5 % e os tamanhos de produto foram determinados ao comparar a escada de DNA (MBI Fermentas). Os produtos de PCR com o tamanho previsto foram seqüenciados usando os primers que foram usados para a amplificação de PCR. O sequenciamento da sequência inserida foi realizado usando o sequ enciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc.) com a finalidade de checar que os clones corretos foram introduzidos nas células de Agrobacterium.

Transformação das plantas de tomate Micro-Tom com genes putativos de algodão - A transformação de tomate (Lycopersicon esculentum, var MicroTom) e o cultivo das plantas transgênicas foram efetuados de acordo com Curtis et al. 1995, e Meissner et. al. 2000, com leves modificações.

EXEMPLO 7

CRESCIMENTO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS DE MICROTOM E CARACTERIZAÇÕES DE FENÓTIPO

Procedimentos Experimentais

Produção das plantas transgênicas de tomate - As plantas foram transformadas conforme descrito no Exemplo 6 acima. Após a transformação,

as plantas de tomate MicroTom T1 foram cultivadas em uma mistura que continha em potes de 1000 ml até o conjunto de fruta. O comprimento do pelo de semente de tomate foi medido.

Resultados Experimentais

As sementes de tomate micro-Tom (T2, origem das plantas T1), que transportam os genes putativos de algodão após a transformação com as células de Agrobacterium transportando os genes de CTF, foram analisadas (Tabela 10 abaixo). A menor média quadrada são os valores previstos correspondentes a alguma combinação dos níveis, após definir todos os outros fatores para algum valor neutro (JMP™ V5). Para cada gene, a influência média geral do gene (menor média quadrada), e o evento que forneceu os melhores resultados (Melhor evento), que pode localizar o potencial do gene, é mostrado na Tabela 10 abaixo. Demonstramos os resultados de. As letras "A, B e C" referem-se aos genes que são significativamente diferentes entre si em $P < 0,05$.

Tabela 10

Análise das sementes de tomate Micro-Tom transportando os genes putativos de algodão

Gene	Número de eventos independentes	Menor média quadrada	Significativo (Teste t comparado a wt)	% comparado a wt	Melhor Evento	% do Melhor Evento comparado a w
CTF165	10	33.8	A	21	40.0	43
CTFI72	10	33.2	A	19	36.3	30
CTF167	9	32.5	A	16	42.7 [a]	53
	8	32.0	A	15	35.0	25
CTF178	7	31.9	A	14	38.3	37
CTF135	8	30.8	A	10	37.3	34
CTF124	9	30.0	B	7	31.7	13

Continuação da Tabela 10						
CTF169	11	29.9	B	7	39.3 [b]	41
CTF166	9	29.8	B	7	36.0 [b]	29
CTF111	8	28.8	B	3	35.0 [b]	25
WT	-	27.9	B	0		
CTF113	7	27.0	B	-3	31.0	11
CTF110	9	27.0	B	-4	39.0b	40
CT101	7	23.4	C	-16	26.0	-7

Tabela 10: Análise das sementes de tomate Micro-Tom (T2, origem das plantas T1) transportando os genes putativos de algodão é apresentada. [a] Melhor evento foi significativamente mais alto do que o melhor evento da expansiva; [b] Melhor evento foi significativamente superior a WT.

EXEMPLO 8

ISOLAMENTO, CLONAGEM E ANÁLISE DOS PROMOTORES ESPECÍFICOS DA FIBRA DE ALGODÃO

Uma das exigências importantes para as plantas projetadas é a de ativar o gene correto no local correto. Com a finalidade de aprimorar a qualidade da fibra, uma exigência básica para as plantas projetadas é um promotor fornecendo um padrão de expressão que é apropriado para desenvolvimento de fibra. Os promotores constitutivos permitem a expressão de genes pré-formados em que o efeito da proteína está presente continuamente por toda a planta. O promotor CaMV35S do Vírus Mosaico de Couve-Flor é um exemplo amplamente usado. Com a finalidade de aprimorar a qualidade da fibra de algodão, é vantajoso combinar os genes alvo com o promotor específico de fibra, para evitar a influência dos genes na estrutura da célula em outros tecidos de algodão, e ativar os genes no tecido da fibra na etapa correta de

desenvolvimento (iniciação, alongamento, maturação, constitutivo de fibra). Os presentes inventores selecionaram e clonaram a sequência genômica dos novos promotores de fibra de algodão conforme abaixo.

Procedimentos Experimentais e Resultados

Clonagem das sequências de promotor dos genes nativos do algodão — Os promotores desejados de algodão foram escolhidos com base no perfil de expressão de seus genes nativos codificados. Os perfis de expressão dos 4 genes escolhidos do algodão CT4 (SEQ ID N°:842), CT9 (SEQ ID N°:843), CT11 (SEQ ID N°:844) e CT74 (SEQ ID NO.845) são apresentados nas Figuras 2a-d.

A seqüência genômica a montante de CT4, CT9, CT11, e CT74 foi clonada do DNA genômico do algodão (Gossypium barbdanse L. var S5), conforme segue.

O DNA genômico total dos tecidos da folha de planta de 4 semanas das plantas de algodão cultivadas (Gossypium barbdanse L. var S5), usando o kit de extração do DNA (Dneasy piarit mini kit, Qiagen, Alemanha). Para o isolamento do promotor do kit Genome Walker™ da BD (BD Biosciences Clontech) foi usado. Além das 4 enzimas de restrição usadas no kit, as enzimas de restrição de final enfraquecida SmaI, EcoRV e Ecl136II também foram usadas. Para cada promotor, um conjunto de dois primers específicos foram usados para a primeira série:

Primers para promotor CT4 foram conforme segue (UP-PCR):

Primer externo: CT4 GSP_R - 5'- GTGGACCCTGAAACATACTCACCAGC -

3′ (SEQ ID N°:846);

Primer interno (Aninhado): CT4 GSPJSTR - 5′-AAGCCATATTGCCAATGTCACTTCCTC -3′ (SEQ ID N°:847);

Para o promotor CT4, a biblioteca foi originada a partir da enzima de restrição Stul.

A sequência putativa de promotor de CT4 clonada usando o procedimento acima é estabelecida pela SEQ ID N°:848.

Primers para o promotor CT74 foram conforme segue (UP-PCR):

Primer externo: CT74 GSP_R - 5-GCATGAGGGTCAGGAGCTGGATAGTAG - 3′ (SEQ ID N°:849);

Primer interno (Aninhado): CT74 GSP_NR - 5′-CTTCTTTGCCTCTCCATCTCTGTATGC -3′ (SEQ ID N°:850)

Para o promotor CT74, a biblioteca foi originada a partir das enzimas de restrição Dral e Pvull.

A seqüência putativa de promotor de CT74 clonada usando o procedimento acima é estabelecida pela SEQ ID N°:851.

Primers para promotor CT11 foram conforme segue (UP-PCR):

Primer externo: CT11 GSP_R - 5′-ACCTGAGGTATTTTGGTMGAGTTCCG-3′(SEQ ID N°:852).

Primer interno (Aninhado): CT11 GSPNR - 5′-CCAATTCAGCTTTCGGAAAATCACG -3′ (SEQ ID N°:853).

Para o promotor CT11, a biblioteca foi originada a partir das enzimas de restrição Smal e Stul.

A seqüência putativa de promotor de CT11 clonada usando o procedimento acima é estabelecida pela SEQ ID N°:854.

Primers para o promotor CT9 foram conforme segue (UP-PCR):

Primer externo: CT9 GSPJR. - 5'-GGCATTTTTAAGATGTGAAACGTCGG-3' (SEQ ID N°:855).

Primer interno (Aninhado): CT9 GSP_NR - 5'-GCTCGACTTTGGGTGGACATGTATGTAG-3' (SEQ ID N°:856).

Para o promotor CT9, a biblioteca foi originada a partir das enzimas de restrição DraI e SmaI.

A sequência putativa de promotor de CT9 clonada usando o procedimento acima é estabelecida pela SEQ ID N°:857.

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit de purificação de PCR (Qiagen) e o sequenciamento dos produtos de PCR amplificados foi realizado, usando o sequenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc).

Para clonagem dos promotores putativos e 5' UTRs, a amplificação de PCR foi realizada usando um novo conjunto de primers (abaixo) para o qual a extensão 8-12 bp que incluía um local de restrição (HindIII, SalI, XbaI, BamHI, ou SmaI) na extremidade 5'. Para cada promotor, os locais de restrição que não existem na sequência de promotor foram selecionados. Além do mais, os locais de restrição nas sequências de primer foram projetados de modo que os produtos resultantes de PCR fossem

clonados no vetor binário pPI ou pGI (vide Exemplo 5 acima) na direção correta, a montante do gene repórter GUS.

A seguir estão os primers usados para o promotor e amplificação de 5′ UTR (P+U) e clonagem no pPI.

CT74_1000:

CT74-pro-F-H (HindIII): (SEQ ID N°:858) - 5′ ATACAAGCTTGTTGAGGGAGATTGATTTCTTTGG - 3′; e CT74-pro-R-SL (Sail): (SEQ ID N°:859) - 5′ CAAAGTCGACAAGATTGGAAGATGTGTGAGTTGAG - 3′.

CT74_1400:

CT74-pro-F-H-2 (Hindlll): (SEQ ID N°:860) - 5′ TGTTAAGCTTGTAAAATCACAGGCTAACTATCACTC - 3′; e CT74-pro-R-SL (Sail): (SEQ ID N°:859).

CT74J700:

CT74_pro_F_H_3 (Hindlll): (SEQ ID N°:861) - 5′ - GTCGAAGCTTTGGTCTGTCCGGATCACTGTG - 3′; e CT74-pro-R-SL (Sail): (SEQ ID N°:859).

CT4_1000:

CT4-pro-F-H (Hindlll): (SEQ ID N°:862) - 5′ ACTTAAGCTTGGTAAAACTTCAACTTGCCTTTG - 3′; e CT4-pro-R-SL (Sail): (SEQ ID N°:863) - 5′ - CAAAGTCGACTTGCCAATGTCACTTCCTCCC -3′.

CT4_1400:

CT4_pro_F_H_2 (Hindlll): (SEQ ID N°:864) - 5′ CAACAAGCTTAGCATGCCACTTTTCACCATC - 3′; e CT4-pro-R-SL (Sail): (SEQ ID N°: 863).

CT11_730:

CT11_pro_F_SL(SalI): (SEQ ID N°: 865) - 5'-ATATGTCGACATTGAGGCCATTAAAGTTCATC-3'; e CT11 jpro_R_Xb (Xbal): (SEQ ID N°: 866) - 5'-CATTCTAGATCTCTTTGATCACTTGCACCTG-3'

CT9_650:

CT9_pro_F_H (Hindlll):(SEQ ID N°: 867) - 5'-TTCGAAGCTTGTCTCCCGTCTAAACTTATCCTG-3'; e CT9_pro_R_SL (SalI):(SEQ ID N°: 868) - 5'-AGGAGTCGACCATGTATGTAGTAATGATAGCAGCTG-3'.

O DNA genômico ou o produto de IPCR/UP-PCR foi usado como modelo de DNA para amplificação de PCR, usando os primers de oligonucleotídeo recém-projetados. Os produtos de PCR foram purificados (Kit de Purificação de PCR, Qiagen, Alemanha) e digeridos com os locais de restrição existentes nos primers (Roche, Suíça). Os produtos digeridos de PCR foram novamente purificados e clonados no vetor binário pPI/pGI, que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. O produto de PCR e o vetor de plasmídio aberto foram ligados usando a enzima de ligase de DNA T4 (Roche, Suíça).

EXEMPLO 9

TRANSFORMANDO AS CÉLULAS DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENCE COM VETORES BINÁRIOS ABRANGENDO OS PROMOTORES DA FIBRA DE ALGODÃO

O vetor binário pPI/pGI, incluindo o promotor CT4, CT11, CT9 ou CT74, a montante do gene repórter GUS foi usado para transformar as células de Agrobacterium.

Procedimentos Experimentais e Resultados

Transformação dos vetores binários incluindo os promotores de fibras de algodão em Agrobacterium tumefaciens - Os vetores binários foram introduzidos nas células competentes de Agrobacterium tumefaciens GV301, ou LB4404 (cerca de 10^9 células/ml) por eletroporação. A eletroporação foi realizada usando um eletroporador MicroPulser (Biorad), 0,2 cm de cubetas (Biorad) e programa de eletroporação EC-2 (Biorad). As células tratadas foram cultivadas no meio líquido LB em 28°C por 3 horas, então laminadas em LB-agar complementados com gentamicina (50 mg/L; para cepas de Agrobacterium GV301) ou estreptomicina (300 mg/L; para a cepa de Agrobacterium LB4404) e canamicina (50 mg/L) em 28 °C por 48 horas. As colônias de Agrobacterium que se desenvolveram no meio seletivo foram analisadas por PCR usando os primers estabelecidos na SEQ ID N°:869 101F: 5'-GCTATGACCATGATTACGCC-3' e SEQ ID N°:870 GUSREV: 5'-CTGCATCGGCGAACTGATCG-3', que foram projetados para expandir a sequência inserida no plasmídio pPI/pGI. Os produtos resultantes de PCR foram isolados e sequenciados, para checar se as sequências corretas foram adequadamente introduzidas nas células de Agrobacterium.

EXEMPLO 10

PROMOTORES ESPECÍFICOS DA FIBRA DE ALGODÃO SÃO EXPRESSOS NAS FOLHAS E FRUTAS DE TOMATE, E EM ARABIDOPSIS E PLANTAS DE ALGODÃO

Para ilustrar a expressão

específica em arabidopsis e tricomas de tomate e nas frutas de tomate, a coloração GUS foi realizada nas plantas transformadas conforme segue.

Procedimentos Experimentais

Transformação de plantas de tomate Micro-Tom com promotores putativos de algodão

A transformação do tomate (Lycopersicon esculentum, var MicroTom) e cultivo das plantas transgênicas foram realizados de acordo com Curtis et al 1995, e Meissner et. al. 2000.

Transformação e cultivo das plantas de Arabidopsis thaliana com promotores putativos de algodão - As plantas de Arabidopsis thaliana Columbia (plantas T0) foram transformadas usando o procedimento de Mergulho Floral descrito por Clough e Bent (1998) e por Desfeux et al. (2000), com pequenas modificações. Brevemente, as Plantas T0 foram semeadas em potes de 250 ml enchidos com mistura de crescimento com base em turfa úmida. Os potes foram cobertos com papel alumínio e uma cúpula plástica, mantidos em 4 °C por 3-4 dias, então descobertos e incubados em uma câmara de crescimento em 18-24 °C por 16/8 horas de ciclo diário/noturno. As plantas T0 estavam prontas para transformação seis dias antes da ântese. As colônias exclusivas das Agrobacterium transportando as construções binárias foram cultivadas no meio de LB complementado com canamicina (50 mg/L) e gentamicina (50 mg/L). As culturas foram incubadas em 28 °C por 48 horas mediante agitação vigorosa e então centrifugadas em 4.000 rpm por 5 minutos.

Os pellets compreendendo as células de Agrobacterium foram novamente suspensos em um meio de transformação contendo meia resistência (2,15 g/L) Murashig-Skoog (Duchefa); 0,044 µM de purina de benzilamina (Sigma); 112 (µg/L B5 de vitaminas Gambourg (Sigma); 5 % de sacarose; e 0,2 ml/L de Silwet L-77 (OSI Specialists, CT) em água dupla destilada, no pH de 5,7. A transformação das plantas T0 foi efetuada ao inverter cada planta em uma suspensão de Agrobacterium, de modo que o tecido de planta acima da terra foi submerso por 3-5 segundos. Cada planta T0 inoculada foi imediatamente colocada em uma bandeja plástica, então coberta com cúpula plástica clara para manter a umidade e foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 18 horas, para facilitar a infecção e transformação. As plantas transformadas (i.e., transgênicas) foram então descobertas e transferidas a uma estufa para recuperação e maturação.

As plantas transgênicas T0 foram cultivadas na estufa por 3-5 semanas até as síliquas ficarem marrom e secas. As sementes foram colhidas das plantas e mantidas em temperatura ambiente até a semeadura. Para gerar as plantas transgênicas T1 abrangendo os genes, as sementes coletadas das plantas transgênicas T0 foram esterilizadas na superfície através de mergulho em 70 % de etanol por 1 minuto, seguido por mergulho em 5 % de hipoclorito sódico e 0,05 % de tritão por 5 minutos. As sementes esterilizadas por superfície foram lavadas completamente em água destilada estéril então colocadas em lâminas de cultura contendo meia resistência Murashig-Skoog

(Duchefa); 2 % de sacarose; 0,8 % de ágar de planta; 50 mM de canamicina; e 200 mM carbenicilina (Duchefa). As lâminas de cultura foram incubadas em 4 °C por 48 horas então transferidas a uma sala de crescimento em 25 °C para uma semana adicional de inclubação. As plantas T1 de Arabidopsis vitais foram transferidas às lâminas frescas de cultura para outra semana de incubação. Após a incubação, as plantas T1 foram removidas das lâminas de cultura e plantadas na mistura de crescimento contidas em potes de 250 ml. As plantas transgênicas foram permitidas a crescer em uma estufa para maturidade.

Transformação dos tecidos de algodão com os promotores putativos de algodão - Os promotores de algodão recémclonados poderiam ser avaliados diretamente nas plantas de algodão ao transformar os vetores binários clonados nos tecidos de algodão para expressão transitória (Kim HJ, Triplett BA. 2001), ou transformação estável do gene, ao usar protocolos comumente usados.

Coloração de GUS - A coloração de Gus das plantas de arabidopsis e tomate foi realizada de acordo com um protocolo de rotina descrito em qualquer local (Jefferson RA. et al. 1987, Meissner et. al. 2000). Brevemente, as folhas são fixadas em acetona gelada de 90 % por 15 - 20 minutos (no gelo), seguido pela remoção de acetona, lavagem do tecido com a Solução de Trabalho [25 mM de Fosfato Sódico (Sigma, EUA) tampão pH = 7, Ferricianeto (Sigma, EUA) 1,25 mM, Ferrocianeto (Sigma, EUA) 1,25 mM, Tritão X-100 (Sigma, EUA) 0,25 %, EDTA (BioLab, Israel) 0,25

mM] por 15-20 minutos (repetir duas vezes). A solução de lavagem é removida, substituída pela solução de Coloração [Solução de trabalho com ácido glucurônico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-p-D (X-GlcA, Duchefa) solubilizado em N,N-Dimetilformamida (BioLab, Israel) 1,5 mg/ml e Ditiotreitol (DTT, Bio Lab) 100 mM] no escuro (tubos envolvidos com folha de alumínio) e incubados à noite em 37 °C. A descoloração é realizada ao afundar o tecido da planta em etanol de 70 % e aquecer em 50 °C por cerca de 2 horas. A etapa de descoloração é repetida até o tecido da planta tornar-se transparente, exceto as regiões coloridas de azul. As plantas descoladas são armazenadas em 70 % de etanol (BioLab, Israel) em temperatura ambiente.

Resultados Experimentais

A Tabela 11 abaixo resume as informações sobre os agrupamentos do gene de algodão e seus promotores clonados e avaliados usados pelos presentes inventores.

Tabela 11

Agrupamentos do gene de algodão e promotores clonados

Promotor	Anotação ORF	Especificidade do Tecido	Nível de Expressão	Descrição de Expressão	Origem do promotor	Comprimento do promotor
CT4	Citocromo P450	Fibra específica	médio	Expressa durante todas as etapas de desenvolvimento da fibra	G. barbdanse L. var S5	1400
CT74	Fator protodermal 1 (PDF1)	Fibra específica	alto	Expressa durante todas as etapas de desenvolvimento da fibra	G. barbdanse L. var S5	1000

Coloração de GUS nas plantas de Arabidopsis T1 - GUS foi expresso sob regulação de CT4 e CT74, os promotores nas plantas de Arabidopsis geneticamente transformadas. Conforme mostrado nas Figuras 3a-f, o alto

nível de expressão foi obtido nas folhas das plantas de Arabidopsis sob o controle dos promotores de CT4 (Figura 3b) ou CT74 (Figura 3c), bem como nas pontas de raiz sob o controle do promotor CT74 (Figura 3f).

Coloração de GUS nas Plantas de tomate T1 - Os resultados para a geração T1 de tomate são resumidos na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12

Arabidopsis - Expressão do gene repórter regulado pelos dois novos promotores comparados ao promotor 35S

	Intensidade Média				
Promotor	Folha	Tricoma da folha	Poro	Raiz	Pontas de raiz
CT4 SEQ ID N°:848	0	1	3	0	0
CT74 SEQ ID N°:851	1	2	5	0	5
35S SEQ ID N°:841	4	2	2	5	5

Tabela 12: Os níveis de intensidade da expressão representam uma média de 4 eventos independentes e são expressos por números arbitrários de 1 a 5, em que 1 = baixa expressão, e 5 = intensidade mais alta, conforme foi estimado por dois observadores independentes. ND - não determinado.

Conforme mostrado na Tabela 12, um alto nível de expressão é obtido sob o controle do promotor CT4 nos poros. Além disso, um alto nível de expressão é obtido sob o controle do promotor CT74 nas pontas de raiz e poros, e um nível moderado de expressão é obtido nos tricomas da folha.

No total, esses resultados demonstram o isolamento de um conjunto dos promotores

específicos da fibra de algodão que permitem a expressão dos genes candidatos no momento correto e resistência correta. Dessa forma, os quatro novos promotores específicos de fibra que foram identificados, isolados e caracterizados no presente estudo exibem diferentes níveis de expressão: muito alta (CT74), alta (CT9), moderada (CT4) e baixa expressão (CT11). Esses promotores foram mostrados como representando diferentes padrões de expressão: iniciação (CT4), alongamento (CT9 e CT74) e expressão constitutiva (CT11).

EXEMPLO 11

AGROINJEÇÃO DAS BOLAS DESENVOLVIDAS DE ALGODÃO - UMA NOVA FERRAMENTA PARA RÁPIDA ANÁLISE DOS GENES E PROMOTORES DIRETAMENTE EM FIBRAS DESENVOLVIDAS

Com a finalidade de demonstrar a expressão do gene relacionado de fibra, os genes devem ser expressos em excesso no tecido relevante, o óvulo. Até agora, um sistema de expressão transitório, que usa os óvulos/fibras de algodão natural cultivados, não existe. Os presentes inventores consideraram um método para infectar as células de óvulo do algodão usando a agroinjeção para demonstrar a expressão em excesso dos genes relacionados à fibra no desenvolvimento de fibra, conforme segue.

Brevemente, o ensaio é com base na co-expressão de um gene marcador e um gene testado. Uma proteína fluorescente verde (GFP) (SEQ ID N°:871) ou GUS-intrão (GUSint, SEQ ID N°:872) como um gene repórter é clonada sob regulação do promotor específico de fibra CT2 (SEQ ID N°:873) (revelado no Pedido de Patente PCT N°

IL2005/000627 para Evogene Ltd.) em cis aos genes testados relacionados à fibra CT1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 20, 22, 27, 40, 71, 74, 75, 76, 81, 82, 84, e 4 (SEQ ID N°s:874-892) (revelados no Pedido de Patente PCT N° IL2005/000627 para Evogene Ltd.) sob regulação do promotor constitutivo CaMV35S (SEQ ID N°: 841). A expressão do gene repórter localiza as fibras que foram transformadas de forma bem-sucedida com a construção. Essas fibras "positivas de repórter" são analisadas para as características de fibra. O suporte do vetor binário é pBI101.3 (Clontech, Acessão N° U12640).

Procedimentos Experimentais

I. Clonagem dos genes selecionados em um vetor binário sob regulação constitutiva e em cis ao promotor CT2::expressão recombinante GFP:

GFP de clonagem no vetor de expressão de pGI - Para clonagem do gene de GFP, os primers para o gene GFP foram projetados para expandir todo o ORP a partir do vetor binário pGFP(+ATG)+35S. Os locais adicionais de endonuclease de restrição foram adicionados à extremidade 5' de cada primer (GFP_ORFJF_Sm2 e GFP_R_Sc) para facilitar a clonagem adicional do GFP ao vetor binário (pGI). Os primers usados para amplificação de PCR foram: GFP_ORF_F_Sm2: 5'-GACCCGGGAAACAATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3' (dianteiro, SEQ ID N°:893); e GFP_R_Sc: 5'-TTGAGCTGTCATEAGGTTGACTTGTATAGTTCATCCATG -3' (reverso, SEQ ID N°:894).

Os produtos de extremidade plana de PCR resultante foram purificados usando o Kit de

Purificação de PCR (Qiagen, Alemanha), digeridos com endonucleases de restrição SmaI/SacI (Roche) e clonados no vetor binário pGI (Figura 1), ao substituir o gene repórter existente GUSint. pGI é uma versão modificada de pBI101.3 (Clontech, Acessão N° U12640). pGI foi construído ao inserir uma sequência de sinal poli-(A) sintética, que se originou do vetor de plasmídio Básico pGL3 (Promega, Acessão GenBank N° U47295, em que a sequência de sinal de poli-(A) sintética está localizada entre os nucleotídeos 4658-4811), no local de restrição HindIII de pBI101.3 (ao reconstituir o local HindIII, a jusante da inserção de poli-(A)inseri), para evitar a possibilidade do efeito de leitura completa do promotor Nos a montante e substituir GUS por GUSint. Para substituir o gene GUSint pelo gene GFP no vetor binário pGI, pGI foi digerido com as enzimas apropriadas de restrição [5' de restrição de prime SmaI e 3' enzima de restrição de prime SacI (Roche - usando o protocolo fornecido pelo fabricante)]. O vetor binário aberto foi purificado a partir do gel usando o kit NucleoTrap (Macherey-Nagel). 5-75 ng de um produto de PCR do gene GFP e 100 ng do vetor de plasmídio de pGI aberto foram ligados em 10 µl do volume de reação de ligação usando a enzima de ligase de DNA T4 (Roche), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os produtos de ligação foram introduzidos nas células de E. coli. As novas construções foram designadas como pGFP(-35s).

Expressão recombinante na bactéria - 60 µl de E. coli, células competentes DH5-α de cepa (cerca de 10^9 células/ml) foram transformados usando 1

µl da mistura de reação de ligação por eletroporação, usando um eletroporador MicroPulser (BioRad), 0,2 cm de cubetas (BioRad) e programa de eletroporação EC-2 (BioRad). As células de E. coli foram cultivadas no meio líquido de 1 ml LB em 37 °C por 1 hora e 0,2 ml da suspensão de célula foram laminadas em lâminas LB-agar complementadas com o antibiótico canamicina de 50 mg/L (Sigma). As lâminas foram então incubadas em 37 °C por 16 horas. As colônias de bactéria foram cultivadas e a expressão foi confirmada por amplificação de PCR usando primers que foram projetados para expandir a sequência inserida no vetor binário. Os primers usados para amplificação de DNA das inserções no vetor binário pGFP(-35s) foram: 101F 5'-GCTATGACCATGATTACGCC-3': (dianteiro, SEQ ID N°:869) e NOS_R; 5'-GCGGGACTCTAATCATAAAAACC-S' (reverso SEQ ID N°:895).

Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose de 1 % e os tamanhos de produto foram estimados ao comparar à escada de DNA (MBI Fermentas). Os produtos de PCR com o tamanho previsto foram sequenciados usando os mesmos primers previamente usados para amplificação de PCR.

O sequenciamento da sequência inserida foi realizado para checar se os clones foram introduzidos na direção correta, e para eliminar a possibilidade de que erros da sequência foram incluídos durante a amplificação de PCR. As sequências de DNA foram determinadas usando o seqüenciador de ABI377 (Amersham Biosciences Inc).

A sequência CT2 de promotor, originada a partir do promotor pGI+CT2 (Pedido de Patente PCT N° IL2005/000627 aos presentes inventores) foi clonada ao digerir o vetor de promotor pGI+CT2 com as endonucleases de restrição HindIII e BamH1 (Roche) e ligada às construções binárias (pGFP(-35s)), digeridas com as mesmas enzimas. Os produtos de ligação foram introduzidos nas células de E. coli e com triagem para colônias positivas com primers: (dianteiro 101F, SEQ ID N°:869) e (reverso GFP_R1, SEQ ID N°:896 5'- CACCTTCACCCTCTCCACTG -3').

Os vetores de pCT, abrangendo os genes testados [CT1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 20, 22, 27, 40, 71, 74, 75, 76, 81, 82, 84, 4, SEQ ID N°s. 874-892; (revelados no Pedido de Patente PCT N° IL2005/000627 para Evogene Ltd.)] foram digeridos com endonuclease de restrição HindIII (Roche) e desfosforilados com Fosfatase Alcalina (camarão; Roche). O promotor CT2::GFP foi amplificado usando o primer incluindo o local de enzima de restrição HindIII. Os primers usados para amplificação de PCR foram: CT2_pro_H: 5'-TTCAAGCTTTTTTTGTTTGTTGTGGGGG-3' (dianteiro, SEQ ID N°:897) e NOS_ter_R_H: 5'- GGTTAAGCTTCGACGGCCAGTGAATTCC -3' (reverso, SEQ ID N°:898).

Os produtos resultantes de PCR de extremidade plana foram purificados usando o Kit de Purificação de PCR (Qiagen, Alemanha) digeridos com HindIII (Roche) e clonados em cada um dos vetores binários de defosforilação de pCT (Vide Figura 6 para um vetor exemplar). Os produtos de ligação foram introduzidos nas

células de E. coli e passados por triagem para colônias positivas com primers: (dianteiro 101F, SEQ ID N°:869) e 35S_R: 5'- GGACCACTGTCGGTAGAGGC -3' (reverso, SEQ ID N°:899).

II. Clonagem dos genes selecionados em um vetor binário sob regulação constitutiva e em cis para promotor CT2::expressão recombinante de GUS:

Clonagem dos genes testados no promotor vetor de expressão pGI+CT2 - Para a clonagem dos genes testados sob a regulação do promotor 35S, os primers para o promotor 35S e terminador NOS foram projetados. Os locais adicionais de endonuclease de restrição HindIII (Roche) foram adicionados à extremidade 5' de cada primer para facilitar a clonagem adicional dos genes testados [CT1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 20, 22, 27, 40, 71, 74, 75, 76, 81, 82, 84, 4, SEQ ID N°s:874-892; (revelados no Pedido de Patente PCT N° IL2005/000627 para Evogene Ltd.)], ao vetor binário (promotor pGI+CT2). Primers usados para amplificação de PCR foram: 5' -TTCTCTAAGCTTGCATGCCTGC -3' (dianteiro, SEQ ID N°:900) e 5'-GGTTAAGCTTCGACGGCCAGTGAATTCC-3' (reverso, SEQ ID N°:901). Cada um dos genes acima foi clonado no promotor CT2 GUS pGI+CT2-promotor (Pedido de Patente PCT No. IL2005/000627). O plasmídio de Promotor CT2::GUS foi digerido usando endonucleases HindIII (Roche) e defosforilação com Fosfatase Alcalina, camarão (Roche).

Os produtos de ligação (vide Figura 7 para um vetor exemplar) foram introduzidos nas células de E. coli e passados por triagem para colônias

positivas conforme previamente descrito.

Transformação de Agrobacterium dos plasmídios binários abrangendo os genes de interesse e expressão em óvulos de algodão - Cada uma das 38 construções binárias, compreendendo o promotor 35S a montante de cada um dos genes testados CTs e promotor CT2::GFP ou GUS foi transformado em óvulos desenvolvidos do algodão via transformação de Agrobacterium tumefacience.

60 µl das células competentes C58 de Agrobacterium tumefaciens (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 cubetas (BioRad) e programa de eletroporação EC-2 (BioRad).

As células de Agrobacterium foram cultivadas em 1 ml LB+ 50 mg/L de Carbenicillina + 50 mg/L de meio líquido de Rifampicillina em 28 °C por 3 horas e 0,08 ml da suspensão de célula foi laminado em lâminas de LB-agar complementadas com os antibióticos 50 mg/L de Carbenicillina + 50 mg/L de Rifampicillina + 50 mg/L de Canamicina. As lâminas foram então incubadas em 28 °C por 72 horas. As colônias de Agrobacterium foram cultivadas e a amplificação de PCR foi realizada nas células de Agrobacterium, usando primers que foram projetados para expandir a sequência inserida no vetor binário. Os primers usados para amplificação de PCR foram para GUS:

pGI(promotor CT2)+CT20(promotor 35S)

Dianteiro, CT20__F_2 (SEQ ID N°:902) 5'-

ACGGAGTCAACTCAGAATCG - 3'; e Reverso, CT2_pro_R_2 (SEQ ID N°:903) 5' -TGCATTATTCAAACCCTGTCTCC - 3'.

pGI(promotor CT2)+CT82(promotor 35S)

Dianteiro, CT82JRTJF (SEQ ID N°:904) 5' TCTCTAAGCGACGAAACGGGT - 3'; e Reverso, CT2_pro_R_2 (SEQ ID N°:903).

pGI(promotor CT2 + expansina (SEQ ID N°: 905) (promotor 35S)

Dianteiro, p35s_R (SEQ ID N°:899) e Reverso, CT2_pro_R_2 (SEQ ID N°903).

Para a construção de GFP: Dianteiro 101F, (SEQ ID N°:869) e Reverso, GFP_R1 (SEQ ID N°:896) 5'- CACCTTCACCCTCTCCACTG -3.'

Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose de 1 % e os tamanhos de produto foram determinados por comparação da escada de DNA (MBI Fermentas).

Ensaio transitório mediado por Agrobacterium tumefaciens para bolas de algodão - 5 ml das culturas de Agrobacterium (C58) foram cultivados à noite de colônias individuais em 28 °C em meio LB mais antibióticos seletivos. No próximo dia, as células de cultura foram recuperadas por centrifugação, novamente suspensas em meio de infiltração (10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de MES, 200 µM de acetosiringona, pH 5,6) para densidade ótica = 2, e incubadas em temperatura ambiente com agitação suave (20 rpm) por um mínimo de 2 horas. As culturas foram combinadas quando exigidas, coletadas com uma seringa, e 300 µl foram injetados nas bolas de algodão ao usar uma agulha.

Agroinjeção - As bolas de algodão (Gossypium. hirsutum cv Coker/DP&L90) em diferentes etapas de desenvolvimento 0, 2, 4 e 6 dias pós-ântese (DPA) foram infiltradas (com a agrobactéria abrangendo o vetor binário) usando uma seringa de 1-ml com uma agulha de 0,5-316-mm (BD Pastipak). A agulha foi introduzida em 1 a 2 mm em profundidade no tecido de fruta, e a solução de infiltração foi suavemente injetada na fruta. O volume total da solução injetada variou com o tamanho da fruta, com um mínimo de 0,1 ml e um máximo de 0,3 ml.

Coloração de GUS dos óvulos de algodão - As folhas foram fixadas em 90 % de acetona gelada por 15 - 20 minutos (no gelo), seguido pela remoção da acetona, o tecido foi enxaguado com a Solução de Trabalho [25 mM de Fosfato de Sódio (Sigma, EUA) tampão pH = 7, Ferricianeto (Sigma, EUA) 1,25 mM, Ferrocianeto (Sigma, EUA) 1,25 mM, Tritão X-100 (Sigma, EUA) 0,25 %, EDTA (BioLab, Israel) 0,25 mM] por 15-20 minutos (repetir duas vezes). A solução de enxágüe foi removida, substituída pela solução de Coloração [Solução de trabalho com ácido glucurônico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronic (X-GlcA, Duchefa) solubilizada em N,N-Dimetilformamida (BioLab, Israel) 1,5 mg/ml e Ditiotreitol (DTT, Bio Lab) 100 mM] no estudo (tubos envolvidos com papel alumínio) e incubados à noite em 37 °C. A descoloração foi realizada ao afundar o tecido da planta em etanol de 70 % e aquecer em 50 °C por cerca de 2 horas. A etapa de descoloração é repetida até o tecido de a planta tornar-se transparente, exceto as regiões coloridas de azul.

As plantas descoladas foram armazenadas em 70 % de etanol (BioLab, Israel) em temperatura ambiente.

Resultados Experimentais

Detecção da agroinjeção positiva usando GUS - A validação do processo de agroinjeção foi realizada usando a agroinjeção de GUS sob regulação dos promotores CT2 e 35S em 1 e 8 DPA. Após dois dias (3 e 10 DPA), a bola desenvolvida foi retirada e os óvulos foram de coloração de GUS (Figuras 4a-c).

Análise das fibras desenvolvidas de algodão - A primeira validação da detecção de gene foi realizada usando a agroinjeção de 2 óvulos de DPA com duas construções: 35S::CT20, CT2pro::GFP; 35S::expansina, CT2pro::GFP; Após dois dias (4 DPA), a bola desenvolvida foi retirada e os óvulos passaram por triagem para análise de fibra. Com a finalidade de detectar o comprimento da fibra desenvolvido, os presentes inventores fizeram uma fatia com relação à largura de cerca de 0,2 mm. As fatias passaram por triagem para expressão de GFP sob luz UV usando lentes de microscópio de 10X. O GFP positivo foi os pontos sobre a infiltração positiva. O comprimento da fibra desenvolvido os óvulos de GFP positivos foi determinado (em mícron) usando escala de lente. Com a finalidade de medir o efeito de cada um dos gene selecionados sobre o desenvolvimento de fibra, três diferentes flores de agroinjeção foram usados; em cada flor, três diferentes óvulos foram medidos. As medições do comprimento da fibra são resumidas na Tabela 13, abaixo. A

partir dos resultados, é possível ver que a expansina (Figura 5 c) e CT20 (Figura 5b) exibiram um efeito de alongamento sobre as 4 fibras desenvolvidas de DPA conforme comparado ao controle (Figura 5a). A quantificação de tal efeito de alongamento é ilustrada na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13

Influência da expressão em excesso dos novos genes em 4 fibras desenvolvidas de DPA sobre o comprimento da fibra

construção	Comprimento da fibra
35S::expansina, CT2pro::GFP	12,5
35S::CT20, CT2pro::GFP	11,8
CT2pro::GFP	10,6

Ao usar a agroinjeção, os presentes inventores demonstraram a influência dos genes de algodão sobre o desenvolvimento de fibra, e a detecção da expressão dos genes repórteres. Sob o controle de transcrição dos promotores da fibra de algodão. Os estudos prévios demonstraram que as linhas de algodão transgênico expressando em excesso a fibra produzida de Expansina do comprimento aumentado (Pedido de Patente Norte-Americano N° US20040006794). Esse estudo mostra que a agroinjeção da expansina em 4 fibras desenvolvidas de DPA resulta em um comprimento ampliado da fibra conforme comparado ao controle. O alongamento das 4 fibras desenvolvidas de DPA também foi observado por expressão em excesso de CT20 (SEQ ID N°:881). Nos estudos anteriores, os presentes inventores demonstraram a possibilidade de uso do pelo de semente de tomate como modelo para a fibra de algodão e mostraram que o pelo de semente de tomate significativamente alongado CT20 comparado ao tipo selvagem (0,366 ± 0,006 mm comparado a

0,319 ± 0,008) (Pedido de Patente PCT N° IL2005/000627 aos presentes inventores). Neste estudo, os presentes inventores mostraram, pela primeira vez, que a expressão dos genes de desenvolvimento de fibra, tal como, CT20 e expansina às fibras já desenvolvidas (p.ex., 2, 4 ou 8 DPA) podem significativamente alongar as fibras de algodão.

Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com suas realizações específicas, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão aparentes para aqueles com habilidade na técnica. De forma correspondente, é pretendida para abranger todas as tais alternativas, modificações e variações que ficam dentro do amplo espírito e escopo das reivindicações anexas.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados nesta especificação são ora incorporadas em sua totalidade por referência à especificação, na mesma medida como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual tenha sido específica e individualmente indicado como 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 invenção. Na medida em que os títulos das seções são usados, eles não devem ser interpretados como necessariamente limitantes.

REFERÊNCIAS

(Referências adicionais mencionadas no texto)

Clough S.J, e Bent A.F (1998). Mergulho Floral: um método

simplificado para a transformação mediada por Agrobacterium de Arabidopsis thaliana. Planta J. 16, 735-43.

Curtis I.S, Davey M.R, e Power J.B. 1995. Transformação de disco da folha. Métodos Mol. Biol. 44,59-70.

Desfeux C, Clough S.J, e Bent A.F (2000). Tecidos reprodutivos de fêmeas são o alvo primário da transformação mediada por Agrobacterium pelo método de mergulho floral de Arabidopsis. Fisiol. de Planta 123, 895-904.

Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson AO. Vetores pGD: ferramentas versáteis para a expressão das fusões de proteína fluorescente verde e vermelha em folhas de planta agroinfiltradas. Planta J. 2002 Aug;31(3):375-83.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. Fusões de GUS: beta-glucuronidase como um marcador de fusão de gene sensível e versátil em plantas mais altas. EMBO J. 1987 Dec 20;6(13):3901-7 Kapila et al. 1997

Kapila J., de Rycke R., van Montagu M. und Angenon G. (1977): "Um "sistema de expressão de gene transitório mediado por "Agrobacterium' para folhas intactas". Ciência de Planta 122,101-108.

Kim H.J, e Triplett B.A. 2001. Crescimento da fibra de algodão na planta e in vitro. Modelos para a biogênese de alongamento da célula de planta e parede celular. Fisiol. de Planta 2001 Dez;127(4):1361-6.

Meissner R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y, Levy A.A. 2000. Avanço técnico: um sistema de produção alta para etiquetagem de transposição e detenção de promotor em tomate. Planta J. 22, 265-74.

Orzaez D., Mirabel S., Wieland WH, Granell A. 2006; Fisiologia de Planta, 140: 3-11.

Ruan Y.L, Llewellyn D.J, e Furbank R.T. 2003. Supressão da expressão do gene de sintase de sacarose reprimindo a iniciação da célula de fibra de algodão, alongamento e desenvolvimento de semente. Célula de planta 15, 952-964.

Wagner. G.J, Wang. E e Shepherd. R.W. 2004. Novas abordagens para estudar e explorar uma antiga protuberância, o tricoma da planta. Ann. Bot. 93, 3-11.

Wang E, Gan S, e Wagner G.J. 2002. Isolamento e caracterização do promotor específico de tricoma CYP71D16 a partir de Nicotiana tabacum L. J Exp Bot. 53(376):1891-7.

Yang Y, Li R, Qi M. Análise in vivo dos promotores de planta e fatores de transcrição por agroinfiltração das folhas de tabaco. Planta J. 2000 Jun;22(6):543-51.

REIVINDICAÇÕES

1. “CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS”, caracterizada pelo fato de compreender uma sequência de ácidos nucléicos conforme estabelecida na SEQ ID Nº 63 e suas degenerações codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 192 e uma sequência regulatória heteróloga operativamente ligada à mesma, em que o referido polipeptídeo é capaz de regular o desenvolvimento de fibra, em que a referida sequência regulatória heteróloga é o promotor conforme estabelecido na SEQ ID NO: 841, 848, 851, 873, 857 ou 854.

2. “CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS” de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida sequência regulatória compreende uma sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº: 851, 848, 857 ou 854.

3. “CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS” de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a referida fibra compreende uma fibra de algodão.

4. “MÉTODO PARA APRIMORAR O COMPRIMENTO DE FIBRA DE UMA PLANTA QUE PRODUZ FIBRA”, o método caracterizado pelo fato de compreender a transformação de uma planta produtora de fibra com uma construção de ácidos nucléicos como definida na reivindicação 1 ou 2, assim aprimorando o comprimento de fibra da planta que produz fibra.

5. “MÉTODO” de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a referida

planta que produz fibra é selecionada a partir do grupo consistindo em algodão, árvore de algodão de seda, salgueiro do deserto, arbusto de creosoto, winterfat (*Krascheninnikovia lanata*), balsa, ramie, kenaf (*Hibiscus cannabinus*), cânhamo, roselle (*Hibiscus sabdariffa*), juta, abacá de sisal e linho.

6. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS", de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o referido desenvolvimento de fibra compreende a formação de fibra.

7. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICOS" de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o referido desenvolvimento de fibra compreende o alongamento de fibra.

8. "MÉTODO PARA PRODUZIR FIBRAS DE ALGODÃO", o método caracterizado pelo fato de compreender:

(a) gerar uma planta transgênica de algodão transformada com a construção de ácidos nucléicos como definida na reivindicação 1 ou 2 e

(b) colher as fibras da referida planta transgênica de algodão, assim produzindo as fibras de algodão.

Plasmídio binário pGI - Mapa

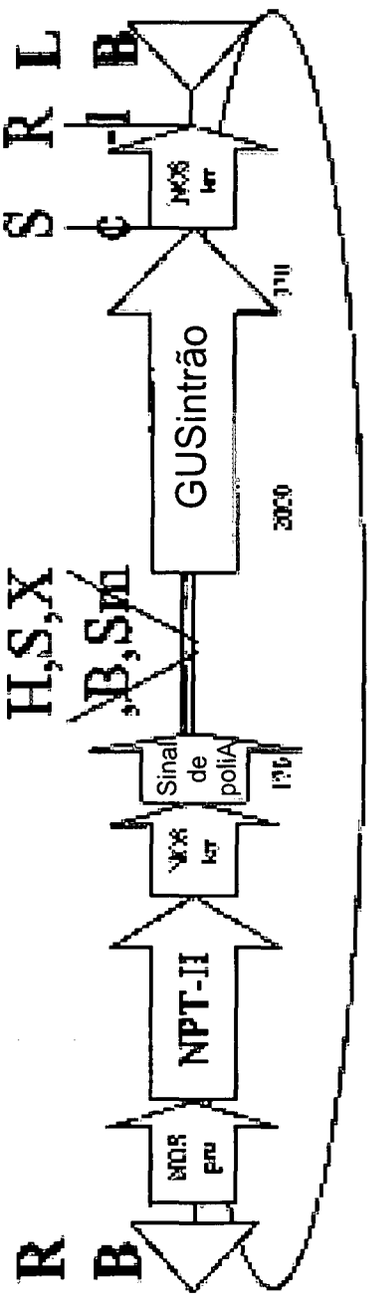


FIG.1

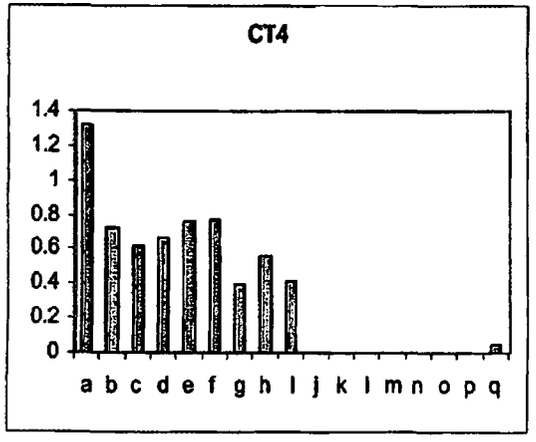


FIG.2A

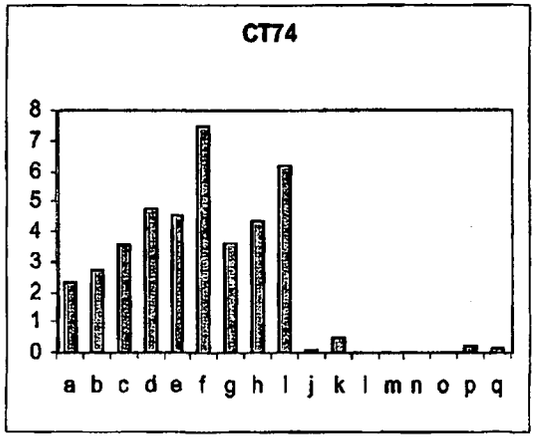


FIG.2B

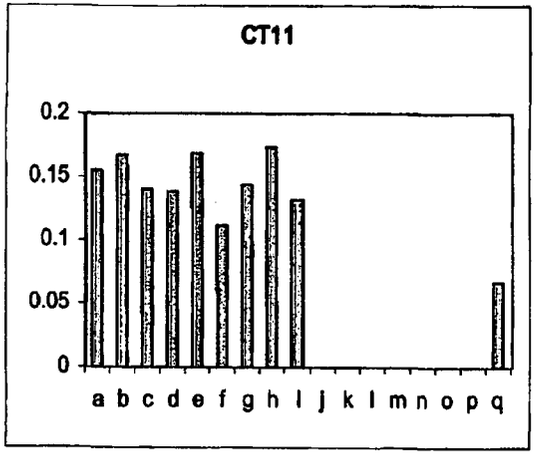


FIG.2C

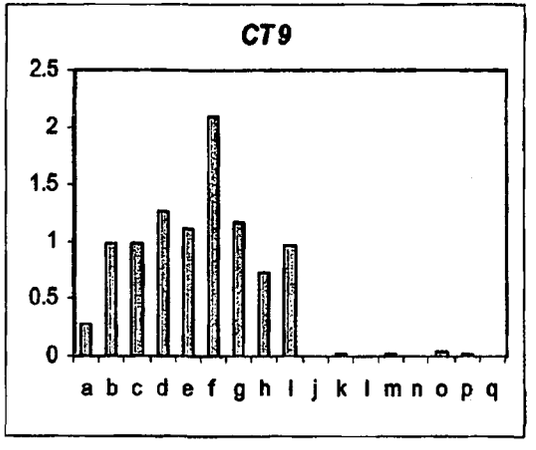
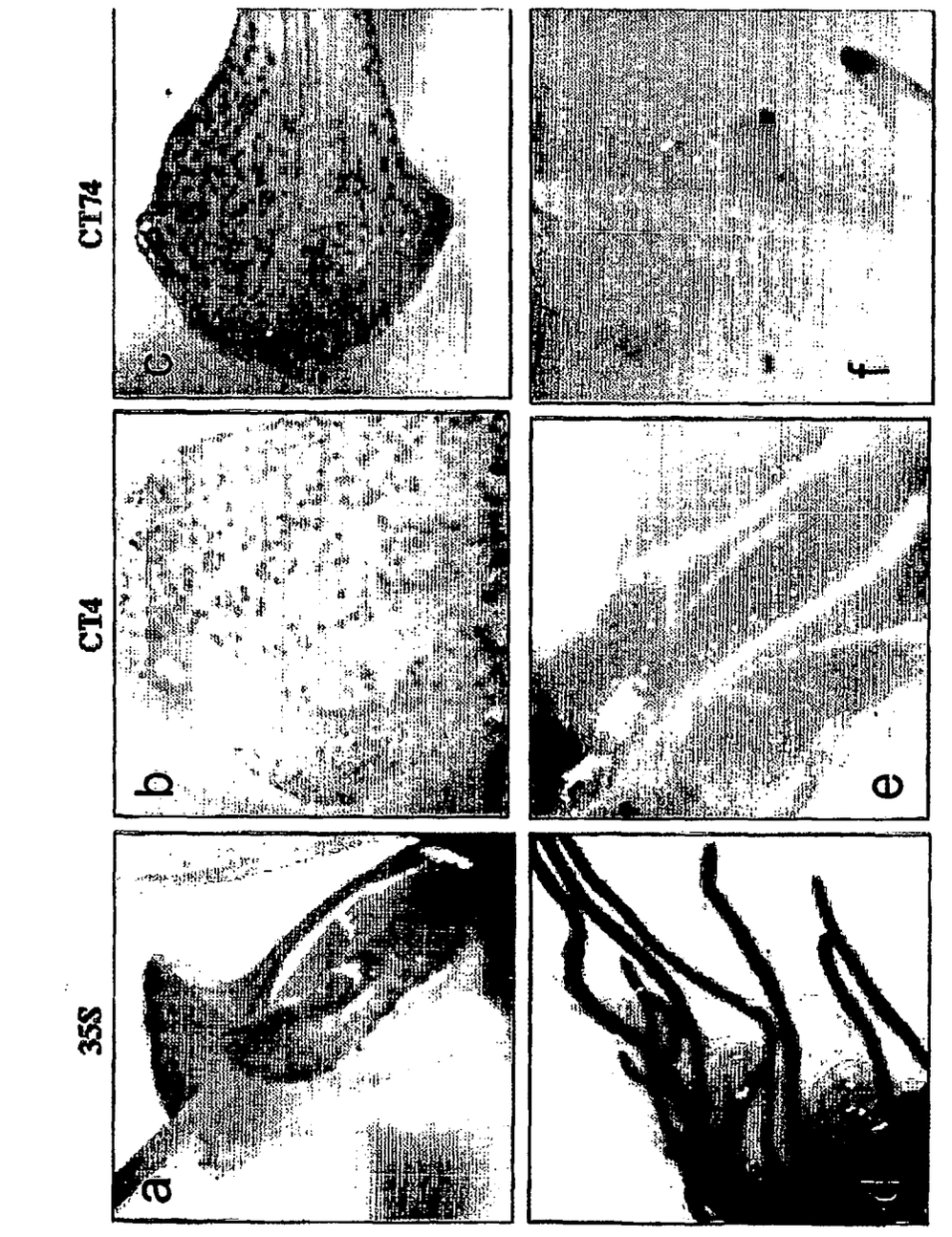


FIG.2D



FIGS.3A-F

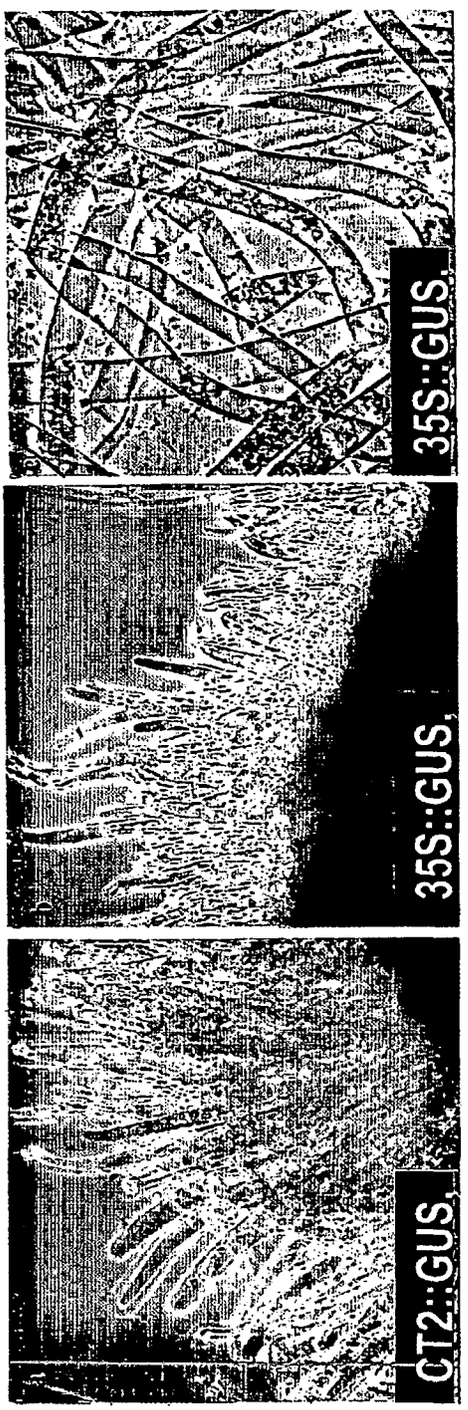


FIG.4A FIG.4B FIG.4C

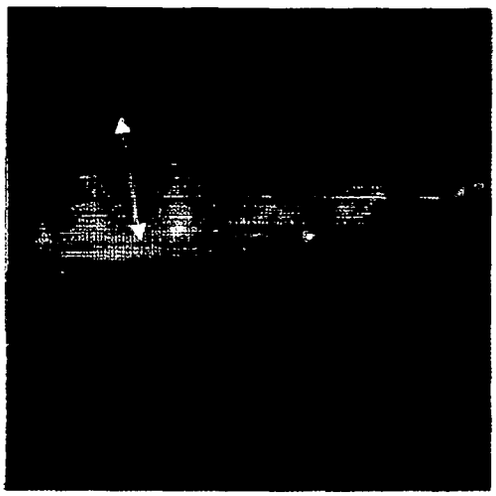


FIG.5A

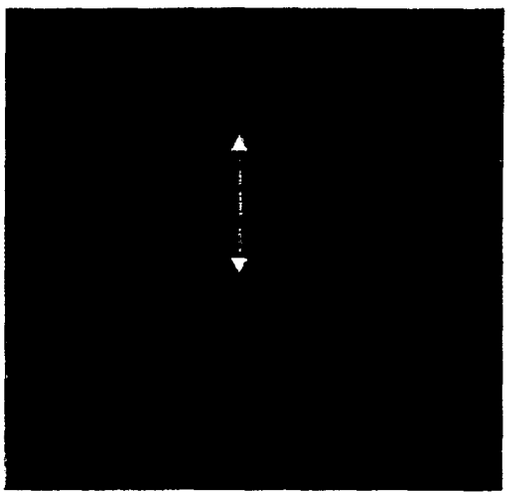


FIG.5B

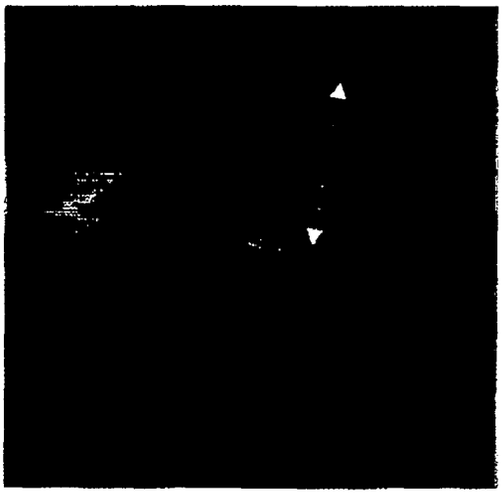
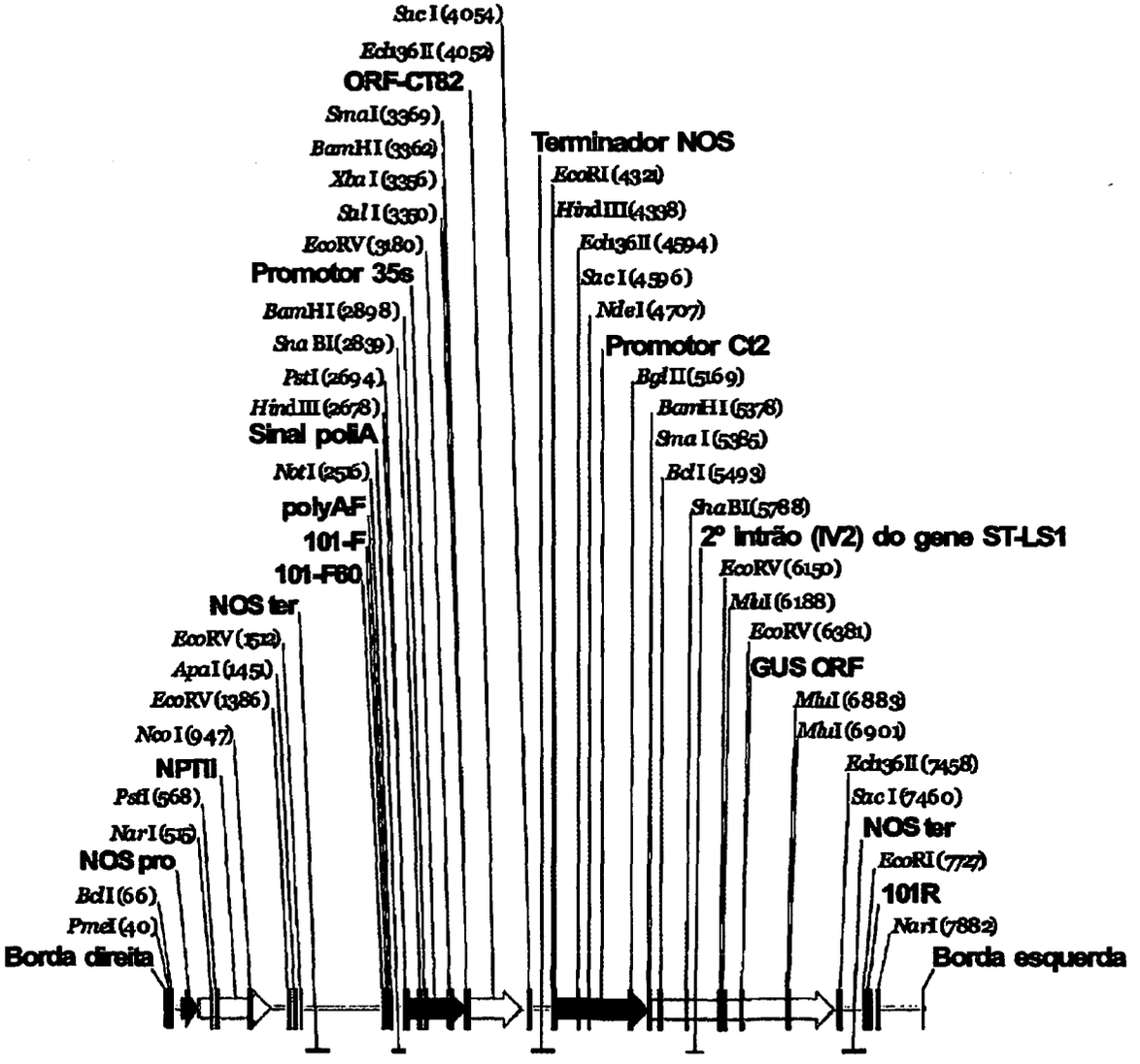
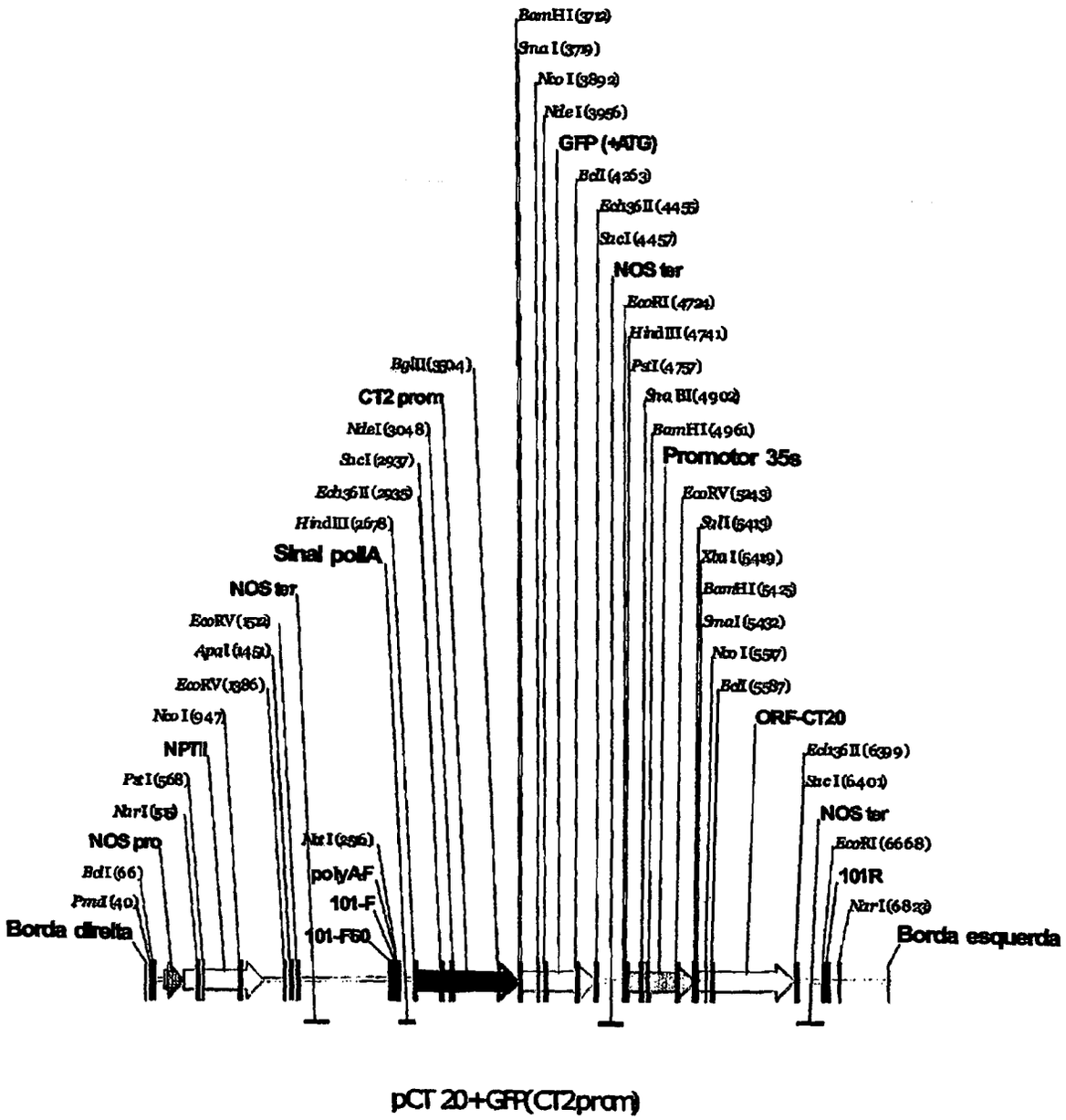


FIG.5C



pGI(CT2 promotor)+CT82(35S promotor)

FIG.6



pCT 20+GFP(CT2prom)

FIG.7