



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

(11) BR 102012006552-5 B1



(22) Data do Depósito: 22/03/2012

(45) Data de Concessão: 09/03/2021

(54) Título: VETOR DE DNA CONTENDO GENE DE CANA-DE-AÇÚCAR, PLANTAS TOLERANTES A ESTRESSES ABIÓTICOS, MÉTODO DE PRODUÇÃO E USOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/29; C12N 15/82.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP.

(72) Inventor(es): MARCELO MENOSSI TEIXEIRA; ANDREA AKEMI HOSHINO; GIANE CAROLINA BUENO; ÉDER BEDANI RUIS CHAGAS; CÉSAR BUENO DE SOUZA.

(57) Resumo: VETOR DE DNA CONTENDO GENE DE CANA-DE-AÇÚCAR, PLANTAS TOLERANTES A ESTRESSES ABIÓTICOS, MÉTODO DE PRODUÇÃO E USOS. A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância abióticos são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares tolerantes à seca devido ao fato de esse ser um dos tipos de estresse abiótico mais severo pelo qual plantas podem ser submetidas, já que afetam todas as suas funções, reduzindo seu crescimento e, consequentemente, sua produtividade. A presente invenção, portanto, descreve um método de produção de plantas que apresentam maior tolerância a estresses abióticos pois elas contêm em suas células uma sequência de nucleotídeos de cana-de-açúcar cuja superexpressão desse gene leva a planta em questão a tornar-se mais tolerante, por exemplo, aos períodos de seca ou aumento de salinidade do solo. De uma forma mais ampla, descreve-se um polinucleotídeo que codifica a proteína de cana-de-açúcar, o qual é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas.

VETOR DE DNA CONTENDO GENE DE CANA-DE-AÇÚCAR, PLANTAS TOLERANTES A ESTRESSES ABIÓTICOS, MÉTODO DE PRODUÇÃO E USOS

CAMPO DA INVENÇÃO

As plantas são influenciadas por um grande número de fatores ambientais e recorrentemente estresses abióticos como seca, salinidade, temperatura, e radiação são mais graves e afetam todas as funções da planta, resultando em redução do crescimento e da produtividade. Estima-se que os estresses abióticos reduzam a produtividade em 50% e em alguns casos até 70%. Isso tem levado a esforços para a identificação e a compreensão dos mecanismos de resposta a estresses, visando o desenvolvimento de novas cultivares mais tolerantes.

Neste sentido, a presente invenção descreve um método para produção de plantas transgênicas mais tolerantes a estresses ambientais graças à introdução de um vetor de DNA, que contém um gene de cana-de-açúcar que apresenta similaridade com proteínas ISP ("iron sulfur protein"), a qual é componentes do complexo formador do citocromo b6f, além da construção do vetor e seus usos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

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

Dentre as tecnologias para produção de plantas tolerantes, a transformação por *Agrobacterium* (Hooykaas PJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium and plant genetic engineering*. Plant Mol Biol 19: 15-38; Barton KA, Chilton MD (1983) *Agrobacterium Ti plasmids as vectors for plant genetic engineering*. Methods Enzymol 101: 527-539), a transferência direta de genes em protoplastos (Gharti-Chhetri GB, Cherdshewasart W, Dewulf J, Paszkowski J, Jacobs M, et al. (1990) *Hybrid genes in the analysis of transformation conditions*. 3. Temporal/spatial fate of NPTII gene integration, its inheritance and factors affecting these processes in *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Mol Biol 14: 687-696; Lyznik LA, Peng JY, Hodges TK (1991) *Simplified procedure for transient transformation of plant protoplasts using polyethylene glycol treatment*. Biotechniques 10: 294-300; Rodenburg KW, de Groot MJ, Schilperoort RA, Hooykaas PJ (1989) *Single-stranded DNA used as an efficient new vehicle for transformation of plant protoplasts*. Plant Mol Biol 13: 711-719 e Ballas N, Zakai N, Loyter A (1987) *Transient expression of the plasmid pCaMVCAT in plant protoplasts following transformation with polyethyleneglycol*. Exp Cell Res 170: 228-234) e o bombardeamento de partículas (Klein TM, Wolf ED, Sanford JC (1987) *High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells*. Nature 327: 70–73) são as mais utilizadas.

Nos últimos anos, tem-se obtido grande avanço nas tecnologias para a transformação de plantas e as pesquisas tem se voltado para a necessidade de desenvolver métodos eficazes de transformação genética das principais espécies de interesse experimental e econômico. A agrotransformação tem ganhado grande aceitação pela facilidade do método e a alta taxa de plantas transgênicas geradas. Por outro lado, o tabaco tem sido amplamente utilizado como modelo para estudos

envolvendo transformação gênica pela facilidade de transformação e rápida obtenção de gerações transformadas. Desta forma, genes de diferentes espécies podem ser avaliados inicialmente em tabaco, pela facilidade e rapidez na produção e análise das plantas transgênicas. Isso tem ocorrido com genes de cereais, produtos hortícolas, plantas ornamentais e medicinais, árvores frutíferas, pastagens, dentre outros. Assim, embora o tabaco seja uma planta dicotiledônea, ele oferece evidências claras de que genes de monocotiledôneas, como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz, possam conferir tolerância a estresses abióticos tanto em plantas monocotiledôneas como dicotiledôneas.

Mais recentemente, com a chegada de novas tecnologias como o sequenciamento genômico e os microarranjos (**Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet 9: 387-402**) tem aumentado a quantidade de informação sobre os genes, até o ponto do patenteamento de genomas completos (**Stix G (2006) Owning the stuff of life. Sci Am 294: 76-83 e Stott M, Valentine J (2003) Impact of gene patenting on R&D and commerce. Nat Biotechnol 21: 729-731; author reply 731**). A partir dessas novas abordagens, um grande número de genes vem sendo identificado. Dessa forma, tem-se buscado cada vez mais o patenteamento de plantas ricas em alguns nutrientes e vitaminas, que apresentem aumento na produção ou na tolerância a estresses, entre outros.

Dentre os tipos de estresse, os abióticos tem tido um interesse particular para aplicação na agricultura devido ao efeito negativo sobre o desenvolvimento geral e a produtividade, bem como pelo temor às mudanças climáticas. Um dos tipos de estresse mais estudado e, conseqüentemente, com alto número de patentes é a seca, que é a principal causa de déficit hídrico ou estresse osmótico nas plantas (**Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, et al. (2008) Drought**

tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crops Research 105: 1-14).

Uma das mais recentes técnicas de análise de expressão gênica, denominada microarranjos ou chips de DNA, tem permitido associar função a genes até então desconhecidos. Essa técnica permite conhecer a expressão de centenas a milhares de genes distintos usando “tags” moleculares e marcações fluorescentes, que se são detectadas quando uma fita complementar derivada do RNA obtido dos tecidos vegetais em estudo se liga a um “tag”. Desta forma, os chips têm permitido conhecer e identificar genes envolvidos em diferentes processos da planta, como resposta a estresses abióticos, regulação gênica, acúmulo de sacarose, além de resistência a pragas, interação planta-patógeno e etc.

Dentre os diversos genes e polinucleotídeos como diferencialmente expressos sob condições de seca, o que codifica uma proteína com similaridade a ISP (“iron sulfur protein”), componente do complexo formador do citocromo b6f, foi selecionado e o seu papel na proteção contra estresses abióticos é descrito nesta invenção.

O complexo citocromo b6f é encontrado nas membranas dos tilacóides de plantas, cianobactérias e algas verdes (Greer, K. L. Golden, S. S. (1992) **“Conserved Relationship between Psbh and Petbd Genes - Presence of a Shared Upstream Element in Prochlorothrix-Hollandica” Plant Mol Biol 19:355-365**). Esse complexo contém quatro grandes subunidades incluindo o citocromo f, citocromo b6, o Rieske ISP e a subunidade IV, além de 4 pequenas subunidades hidrofóbicas: PetG, PetL, PetM e PetN. A subunidade Rieske ISP é uma das maiores encontradas no complexo e está envolvida na respiração e na transferência de elétrons na fotossíntese

Na fotossíntese, o complexo citocromo b6f está envolvido na transferência de elétrons entre os dois centros de reações fotossintéticas, a partir do fotossistema II para o fotossistema I. A atuação desse complexo ocorre durante a transferência de prótons do estroma do cloroplasto através da membrana do tilacóide. O transporte de elétrons via citocromo b6f é responsável por criar um gradiente de prótons que direciona a síntese de ATP nos cloroplastos (Kurisu, G.; Zhang, H.; Smith, J.L.; Cramer, W.A. (2003). "Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity.". *Science* 302 (5647): 1009–14).

Os mecanismos de tolerância à seca em plantas têm semelhanças com outros tipos de estresses (Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) **Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology 57: 781-803**), uma vez que as mesmas proteínas e osmoprotetores estão envolvidos em respostas moleculares para diferentes tipos de estresse. Adicionalmente, a maioria dos estresses abióticos começa com um tipo de estresse, por exemplo, o osmótico, que logo desencadeia os outros. Isto indica que um gene ou via de transdução de sinais identificada como de resposta a um estresse específico pode estar envolvido na resposta de vários outros tipos de estresse (Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) e Zhu JK (2002) **Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol 53: 247-273**).

Ao nível celular, as membranas servem como uma barreira permeável para a perda de água e de algumas moléculas importantes. Assim, durante o estresse osmótico, a disponibilidade de água intercelular é restrita, e as concentrações extracelulares de solutos é alta. Desta forma, ocorre um fluxo de água para fora das células, causando uma diminuição na turgência da célula e um aumento nas

concentrações intracelulares de solutos. As espécies reativas de oxigênio e toxinas geradas durante esse processo também podem causar um dano extensivo para a célula.

Muitas são as patentes que descrevem diferentes proteínas capazes de conferir tolerância a fatores abióticos como seca e estresse salino. Uma família de proteínas com papel chave na regulação da transdução de sinal induzida pelo estresse é a dos elementos de ligação a DNA ativados em resposta a desidratação (DREB – “drought response element binding” ou CBF – “C-repeat/dehydration-responsive element binding factor”), (Oh S, Song S, Kim Y, Jang H, Kim S, Kim M, Kim Y, Nahm B, Kim J. (2005). *Arabidopsis CBF3/DREB1A and abf3 in transgenic Rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiology.* 138:341-351; Stockinger E, Gilmour S, Thomashow M. (1997). *Arabidopsis Thaliana CBF1 Encodes An AP2 Domain-Containing Transcription Activator That Binds To The C-Repeat/DRE, A Cis-Acting DNA Regulatory Element That Stimulates Transcription In Response To Low Temperature And Water Deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences.* 94:1035-1040). Proteínas CBF/DREB possuem diferentes domínios e foram identificadas em diferentes espécies. Os documentos **US7368630**, **US7259297** e **US7253000** utilizam estes importantes reguladores da transcrição para a produção de plantas transgênicas tolerantes ao estresse hídrico.

A patente **US7368630** descreve um método para a utilização do gene *DREB1A* na produção uma linhagem de células vegetais, tecidos ou plantas com este fator de transcrição, bem como os genes induzidos por desidratação identificados a partir de estudos de microarranjos. Por sua vez, o documento **US7259297**, descreve a produção de plantas transgênicas pela introdução de um gene que codifica um fator de

transcrição DREB, que se liga ao elemento de resposta à seca DRE/CRT (Drought Response Element/Crepeat) e ativa a transcrição de genes localizados em promotores com o referido motivo DRE. Segundo essa patente, a superexpressão do fator de transcrição DREB ativa os genes *Rd29A*, *Rd29B*, *Rd17*, *Rd22*, *DREB1A*, *Cor6*, *Cor15a*, *Erd1* e *Kin1*, induzindo uma resposta rápida da planta quando submetida ao estresse hídrico. E A patente **US7253000** descreve a utilização de uma sequência de ácido nucléico de um dos genes pertencentes ao grupo CBF protegendo seu uso na produção de plantas transgênicas para aumento de tolerância a estresses abióticos.

Outras patentes descrevem o uso de fatores de transcrição envolvidos na tolerância ao estresse como, por exemplo, a **WO2005024028** e **JP2006158402**, que empregam fatores de transcrição tipo “zinc finger” para conferir tolerância a estresse hídrico nas plantas. Por sua vez, o documento **US2008163397**, descreve a utilização do domínio B do fator de transcrição *CAAT-binding*, para obtenção de plantas tolerantes a seca e ao estresse por frio. Da mesma forma, na patente **US2009265813** os autores descrevem a utilização do fator de transcrição AP2 para obtenção de plantas transgênicas relacionadas com múltiplas características, incluindo o crescimento reforçado da raiz e tolerância à seca como resultado final.

As patentes aqui mencionadas são reflexo do potencial biotecnológico dos genes que codificam fatores de transcrição, proteínas quinases e outras proteínas envolvidas nas respostas das plantas à seca. Essas proteínas atuam protegendo diretamente componentes celulares durante a desidratação, bem como amplificando o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos de defesa. Nenhum documento apresenta proteção sobre sequências gênicas que codifiquem proteínas com alta similaridade à proteínas

correspondentes à ISP (“iron sulfur protein”) que é componente do complexo formador do citocromo b6f, como é o caso da presente invenção.

Apesar do crescimento em pesquisas com cana-de-açúcar, são poucos os exemplos de invenções que utilizam genes de cana para produção de plantas com maior tolerância a estresses abióticos. Os pedidos de patente **PCT/BR2011/000201** e **PCT/BR2011/000202** descrevem uso de dois genes de cana-de-açúcar que codificam proteínas de funções desconhecidas, capazes de conferir tolerância à seca e sal em plantas transgênicas de tabaco e um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com alta similaridade com a subunidade β da ATP sintase, que também confere tolerância à seca e salinidade em tabaco.

O uso de genes de cana que dão tolerância a estresses abióticos, em contraponto a genes de outras espécies, permite a produção de plantas transgênicas da cana contendo genes da própria cana, os quais têm maior aceitação pelos consumidores. De fato, 70% dos consumidores dão suporte a modificações genéticas envolvendo genes da própria espécie, em contraste com o suporte de 26% quando se tratam de genes de outras espécies (**Rommens CM (2010) Barriers and paths to market for genetically engineered crops. Plant Biotechnology Journal 8: 101-111**).

Portanto, a presente invenção descreve um vetor que contém uma sequência de DNA de cana-de-açúcar capaz de codificar uma proteína com similaridade a ISP (“iron sulfur protein”), componente do complexo formador do citocromo b6f de diversas espécies. Esta invenção descreve também um método para a construção do vetor para a expressão do referido gene de cana-de-açúcar, bem como um processo de produção de plantas transgênicas de forma a produzir um fenótipo de tolerância a estresse hídrico e salino, maior biomassa e maior fotossíntese, dentre outros possíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método no qual são descritas etapas para a construção de um vetor de DNA recombinante compreendendo um gene de cana-de-açúcar, a inserção desse vetor no genoma de uma célula de planta, a obtenção de uma célula de planta transformada ou células transformadas, regeneração de plantas transformadas de células vegetais e seleção de plantas que apresentam melhores características agronômicas.

Atualmente, um dos principais problemas na agricultura é a seca e, dessa forma, esforços têm sido feitos para melhorar a produtividade e rendimento das plantas sob condições limitantes de água e elevada salinidade.

Dessa forma, o uso da presente invenção permite que as plantas geneticamente modificadas apresentem maior tolerância a estresses abióticos como tolerância à salinidade, seca e sobrevivência após o a combinação de estresses abióticos, adicionalmente, pode-se identificar que essas plantas também podem apresentar aumento ou incremento no rendimento da massa fresca da planta ou aumento ou incremento no rendimento da massa fresca de raízes.

Além das plantas produzidas utilizando o método descrito e o vetor de DNA recombinante compreendendo um gene de cana-de-açúcar, as células vegetais e propágulos, como semente que contenham em seu genoma moléculas do DNA recombinante também são descritas na presente invenção.

A construção do vetor de DNA recombinante no sentido 5' para 3', compreende um promotor funcional em plantas, operacionalmente ligado a um gene que codifica uma proteína de cana de interesse, operacionalmente ligado ao terminador que sinaliza o final da transcrição do gene e fornece um sítio de poliadenilação.

O promotor utilizado para a construção do vetor descrito é selecionado do grupo constituído por promotores induzíveis, promotores constitutivos, promotores

regulados temporalmente, promotores com preferência por tecidos, promotores de estresses específicos, promotores induzíveis por seca, promotores induzíveis pelo déficit de água, e os promotores tecido-específicos.

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

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Fases da transformação genética de tabaco. (A) Produção de explantes utilizados na transformação de tabaco. Sementes de tabaco selvagem foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytigel®. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro ($300\text{-}400\text{ }\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) a 25°C e umidade relativa de 75–80%. (B) Discos foliares de tabaco após a infecção com agrobactérias e mantidas em placa contendo meio MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0,1 mg/L de ácido naftalenocético e 0,0059 g/L de acetoseringona) por 3 dias. (C) Os discos infectados em meio seletivo (sais MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina). (D) Regeneração de plantas tolerantes ao antibiótico canamicina em placas contendo meio

MS com 200 mg/L de canamicina. (E) Transferência das plântulas para fracos contendo meio MS para o alongamento e enraizamento.

Figura 2: Detecção do DNA recombinante inserido no genoma de plantas de tabaco. Visualização de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE corado com brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. São observados os produtos da reação de PCR do gene *nptII* em 6 amostras de plantas transgênicas de tabaco, previamente confirmadas pelo ensaio histoquímico de GUS (colunas de 1 a 6). Na coluna 7 foi analisada a amostra de uma planta não transgênica pelo teste histoquímico de GUS. A coluna C- corresponde a amostras de plantas selvagens, usadas como controle negativo. A coluna C+ a uma amostra do vetor pCambia2301::H05 utilizado na transformação das plantas, como controle positivo.

Figura 3: Análise fenotípica de plantas selvagens (não modificadas geneticamente) e transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 após estresse hídrico. (A) Porcentagem de plantas sobreviventes após tratamento com suspensão de rega. Plantas de dois meses de idade foram privadas de água por 9 dias, rehidratadas por 1 dia e novamente expostas a suspensão de rega por 15 dias e rehidratação por 3 dias. O experimento foi realizado com 6 réplicas biológicas e 3 linhagens transgênicas homozigotas e o número de plantas sobreviventes foi contado após a segunda rehidratação. (B) Aspecto das plantas analisadas após a segunda rehidratação. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de NaCl em discos foliares de linhagens de tabaco transgênico contendo a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Foram analisadas plantas de tabaco de 3 linhagens contendo a SEQ ID NO: 1 e plantas selvagens com dois meses de idade. Os discos foliares foram tratados com 1 mL de meio MS líquido utilizando a metade dos reagentes recomendados suplementado com

0, 200, 300 ou 400 mM de NaCl por 4 dias. O experimento foi realizado com 4 réplicas biológicas contendo três discos de 0,5 cm de diâmetro por réplica. O conteúdo total de clorofila dos discos após o estresse salino foi extraído em 1 mL de acetona e quantificado. * indica a diferença estatística entre plantas transformadas e selvagens para $P < 0,05$ e ** para $P < 0,01$. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Figura 5: Efeitos da suspensão de rega sobre a fotossíntese de plantas transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Plantas de dois meses de idade de 3 linhagens transgênicas e plantas selvagens foram expostas à privação de rega por 9 dias seguido de 1 dia de reidratação. O experimento foi realizado com 5 réplicas biológicas de cada linhagem e a fotossíntese líquida foi medida a cada dois dias utilizando o equipamento IRGA (LCpro+; ADC bioscientific, Reino Unido). * indica a diferença estatística entre plantas transformadas e selvagens para $P < 0,05$ e ** para $P < 0,01$. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Figura 6: Efeito da suspensão de rega sobre a condutância estomática de plantas transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. O delineamento experimental realizado foi o mesmo descrito na figura 3. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Figura 7: Efeito da suspensão de rega sobre a taxa de transpiração de plantas transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. O delineamento experimental realizado foi o mesmo descrito na figura 3. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Figura 8: Análise por PCR em tempo real da expressão do gene que codifica uma proteína de cana com similaridade a ISP ("iron sulfur protein"), que é componente do

complexo formador do citocromo b6f, em amostras de duas variedades de cana-de-açúcar. Entre as variedades utilizadas a RB867515 é considerada tolerante à seca (T) enquanto a RB855536 é considerada sensível (S). As plantas foram cultivadas em campo com irrigação (I) ou sem (S) por 7 meses. As análises utilizaram duas réplicas biológicas, triplicata técnica e o gene da poliubiquitina de cana como gene endógeno. As barras verticais correspondem ao “fold change” da expressão relativa do gene utilizando os dados da variedade sensível na condição de irrigação (SI) como referência. O gráfico ilustra a maior expressão do gene estudado na variedade tolerante e a indução por seca na variedade sensível.

Figura 9: Vetor binário pCambia2301::H05 utilizado na agrotransformação de plantas de tabaco. Os cassetes de seleção, repórter e de expressão do polipeptídeo codificado pela SEQ ID: 1 foram clonados sob controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor CamV35S e utilizando o terminador do gene da nopalina sintase (NOS) de agrobactéria. Para a seleção foi utilizado o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina e como repórter o gene *uidA* que codifica a proteína β -glucuronidase (GUS). O vetor possui também a marca de seleção em bactéria para o antibiótico canamicina (Kana).

Figura 10: Efeito do estresse hídrico e salino sobre o desenvolvimento de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Dez sementes de 3 linhagens transgênicas foram germinadas em meio MS líquido suplementado ou não com 100 mM de NaCl ou 150 mM de manitol. O experimento foi realizado em triplicata e após 20 dias sob agitação de 90 r.p.m., fotoperíodo de 16/8h de luz/escuro e temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, as plantas germinadas foram analisadas. (A) Peso fresco por planta submetida ao estresse hídrico através da exposição a 150 mM de manitol. (B) Peso fresco por planta submetida ao estresse salino através da exposição a 100 mM de

NaCl. (C) Peso fresco por planta crescida em meio MS não suplementado com manitol ou NaCl. * indica diferença estatística entre plantas transformadas e selvagens com $P < 0,05$ e ** para $P < 0,01$. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Figura 11: Fenótipo visual de linhagens de tabaco que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens expostas aos estresses hídrico e salino. (A) Duas plantas por evento independente de transformação e plantas selvagens expostas a 150 mM de manitol. (B) Duas plantas por evento de transformação e plantas selvagens expostas a 100 mM de NaCl. A escala está em centímetros e o delineamento experimental utilizado foi o mesmo descrito na figura 6. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um vetor de DNA recombinante compreendendo a sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 1, referente a um gene de cana-de-açúcar que codifica uma proteína com similaridade à ISP (“iron sulfur protein”), componente do complexo formador do citocromo b6f. A sequência de aminoácidos deduzidos a partir de SEQ ID: 1 está indicada em SEQ ID NO: 2.

Adicionalmente, o presente invento descreve um método para produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais que superexpressam a molécula de ácido nucléico da SEQ ID NO: 1, envolvida na resposta das plantas a estresses abióticos e cuja superexpressão produz uma melhora significativa na resposta da planta a esses estresses. Assim, determina-se que o gene indicado na SEQ ID NO: 1 controla direta ou indiretamente a resposta de plantas contra esses estresses.

A sequência de DNA descrita em SEQ ID NO: 1, da qual se deduz a proteína SEQ ID NO: 2, é usada como parte de um DNA quimérico capaz de produzir uma elevada expressão em células vegetais.

O uso da presente invenção permite a melhoria da produção de plantas que sejam tolerantes a esses estresses abióticos.

Da mesma forma, a invenção compreende as sequências com identidade igual ou superior a 50% à SEQ ID NO: 1, mas não limitantes a somente elas.

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

Para a transformação de plantas, o plasmídeo de preferência também inclui um gene marcador de seleção, embora existam métodos que prescindam do uso desse tipo de gene marcador. Marcadores de seleção de vegetais comumente usados incluem o gene de resistência a canamicina (neomicina fosfotransferase II ou *nptII*), o gene de resistência a higromicina (higromicina fosfotransferase ou *hpt*), o gene de fosfinotricina acetil transferase (*bar*), o gene 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (*epsps*) eo gene da acetolactato sintase (*als*). Na presente invenção, o marcador

de seleção é o gene *nptII*, que permite a seleção dos transformantes com o antibiótico canamicina.

O plasmídeo também pode incluir um gene repórter que fornece uma indicação clara de que a transformação genética foi efetuada através da detecção da atividade da proteína codificada pelo gene repórter. Os genes repórteres mais comumente utilizados são os que codificam a beta-glucuronidase (GUS), a luciferase e a proteína verde fluorescente (GFP). Genes repórteres são muitas vezes colocados nas proximidades do gene de interesse para assegurar que elas são expressas em conjunto e não separadas por eventos do “crossing-over”.

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

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

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

Para a produção de plantas transgênicas, qualquer método adequado para a transformação de monocotiledôneas ou dicotiledôneas pode ser usado, como, por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento de partículas (também conhecida como transformação de biobalística ou biolística). Na transformação mediada por *Agrobacterium*, as células vegetais são colocadas em contato com um inóculo de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o DNA indicado na SEQ ID NO: 1 da invenção. Bactérias do gênero *Agrobacterium* que podem ser utilizados para transformar células vegetais incluem espécies de *Agrobacterium rhizogenes* ou *Agrobacterium tumefaciens*, preferencialmente as cepas *A. tumefaciens* LBA4404, EHA105 ou GV301. *Agrobacterium spp.* são transformadas com o plasmídeo por métodos convencionais conhecidos.

Por sua vez, utilizando-se um protocolo de transformação de discos foliares, bactérias de *A. tumefaciens* com o DNA indicado na SEQ ID NO: 1, clonado em vetor binário, são cultivadas em um meio de crescimento na presença de antibióticos, como por exemplo, canamicina, para selecionar as células bacterianas que possuem o plasmídeo binário. Em seguida, folhas de tabaco selvagem são esterilizadas superficialmente, cortadas em pequenos discos e incubadas numa suspensão de *A.*

tumefaciens por um tempo adequado. Diferentes tecidos podem ser utilizados para a transformação, tais como folhas, talo, flor dentre outros. Após a incubação com *A. tumefaciens* as folhas infetadas são transferidas para meio de cultura *in vitro* por determinado período de tempo. A seleção das plantas transgênicas é iniciada colocando-se as plantas infetadas no meio de seleção *in vitro* com antibiótico. Após o desenvolvimento de plântulas com raízes ocorre a transferência para solo e o crescimento em câmara de crescimento.

Adicionalmente, a presente invenção refere-se às plantas transgênicas transformadas com plasmídeos contendo a sequência indicada em SEQ ID NO: 1, aumentando a tolerância da planta obtida a estresses abióticos, como seca e alta salinidade.

O presente documento também descreve um método para produção de plantas transgênicas que apresentam aumento de tolerância para estresses abióticos, através do aumento dos níveis de expressão de SEQ ID NO: 1. Neste método, é feita a produção de plantas geneticamente modificadas que superexpressem genes que induzam a atividade do promotor do gene endógeno, como é o caso de genes que codificam fatores de transcrição.

Desta forma, este método permite a produção de plantas transgênicas que contém em suas células um gene quimérico com capacidade de expressão em células vegetais, bem como as subsequentes gerações compreendendo a sequência de DNA de SEQ ID NO: 1 e sequências de DNA que permitam a expressão do polipeptídeo SEQ ID NO: 2 em células vegetais.

Plantas transgênicas, de acordo com a invenção, incluem, sem limitação, a plantas de cultivo, monocotiledôneas ou dicotiledôneas e dentre elas podem-se incluir cana-de-açúcar, soja, milho, canola, arroz, algodão, cevada, aveia, grama, trigo, pinhão

manso, mangueira, goiabeira, limoeiro, abacateiro, laranjeira, ameixeira, pitagueira, jabuticabeira, macieira, pessegueira, batateira, ervilheira, tomateiro, roseira, girassol, feijão, eucalipto, abacate, morango, pêra, maçã, goiaba, cacau, limão, maracujá, palma forrageira, mamona, mandioca, seringueira, mate, jacarandá, café, abóbora, melancia, pêssego, pitanga e caju.

Adicionalmente, também são descritas células vegetais e plantas que contêm em seu genoma moléculas de DNA recombinante, tal como descrito e os propágulos e descendentes delas produzidas.

EXEMPLOS

Exemplo 1: ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE A SEQ ID NO:1 E PROTEÍNAS DE OUTRAS ESPÉCIES.

Para verificar se a proteína codificada pela SEQ ID NO:1 é conservada em outras espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas utilizou-se o programa de alinhamento múltiplo ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) nos parâmetros padrão recomendados. O resultado obtido mostrou que a proteína codificada pela SEQ ID NO:1 é altamente conservada entre as espécies.

Exemplo 2: AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DA SEQ ID NO: 1 DE CANA-DE-AÇÚCAR

Para avaliar o padrão de expressão do polinucleotídeo SEQ ID NO: 1 sob seca foi realizada um análise quantitativa por PCR em tempo real conforme descrito por Rocha *et al* (Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Vencio RZN, Vicentini R, et al. (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *Bmc Genomics* 8).

Para tal foram utilizadas amostras de RNA de folhas de uma variedade de cana com maior tolerância à seca (RB867515) e de outra com maior sensibilidade à

seca (RB855536), cultivadas por 7 meses em campo, numa região de baixa pluviosidade, sob irrigação ou não (equivalente à estresse por seca). A amplificação foi realizada em triplicata com duas réplicas biológicas por variedade. Como gene de referência foi utilizado o gene da poliubiquitina de cana.

A expressão do polinucleotídeo SEQ ID NO: 1 foi determinada utilizando o programa qPCR (Pabinger S, Thallinger GG, Snajder R, Eichhorn H, Rader R, Trajanoski Z (2009) QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis. BMC Bioinformatics 10: 268) e o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods 25: 402-408), utilizando a amostra da variedade sensível sob irrigação como referência. A interpretação dos resultados baseou-se na premissa de que a razão da expressão do gene entre duas amostras ("fold change") deveria ser de pelo menos dois para que o gene fosse considerado diferencialmente expresso naquela comparação.

O resultado da análise por PCR em tempo real mostrou indução na expressão do gene que contém a SEQ ID NO:1 em condição de estresse por déficit hídrico na variedade mais sensível (SS), comparada com a condição irrigada (SI) (**Figura 1**). Além disso, pode ser observado nessa Figura que a variedade tolerante possui maior expressão do gene analisado em ambas as condições, quando comparado com a variedade sensível. Esses dados indicam que este gene pode estar relacionado à maior tolerância a seca da variedade RB867515 e que pode ser importante no mecanismo de resposta ao estresse na variedade RB855536, fatos estes confirmados pela presente invenção.

Exemplo 3: CLONAGEM DA SEQ ID NO: 1 DE CANA-DE-AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE UM CASSETTE RECOMBINANTE.

Um plasmídeo com a sequência codificante da proteína similar a proteínas ISP (“iron sulfur protein”) de cana-de-açúcar foi obtido do “Brazilian Clone Collection Center” (BCCCENTER, Jaboticabal, Brasil). A partir desse DNA a sequência codificante, indicada na SEQ ID NO: 1, foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, 5´ CCATGGCGACCTCCGCGG 3´ e 5´ GTGGAAGGCATGAGGTGACC 3´ e então clonada no vetor pGEMT-Easy (Promega, EUA). Posteriormente, um fragmento contendo a SEQ ID NO: 1 foi retirado do vetor pGEMT-Easy com a enzima *EcoR* I e inserido no vetor pRT104 digerido com a mesma enzima.

A orientação da clonagem foi verificada por digestão enzimática e um clone com a região codificante clonada no sentido senso em relação ao promotor foi escolhido e validado por sequenciamento. O cassete de expressão foi então liberado pela digestão com *Hind* III e clonado no vetor de expressão pCAMBIA 2301 (Cambia, Austrália), também digerido com a mesma enzima. A construção recombinante final resultante, pCAMBIA2301::H05 (**Figura 2**) foi introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 .

Exemplo 4: PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

Sementes selvagens de tabaco (*Nicotiana tabacum*, var. SR1) foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytigel (Sigma, EUA). As plantas foram transferidas para potes e cultivadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro (300-400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75–80%.

Folhas de tabaco foram cortadas em discos pequenos e incubadas com suspensões de *A. tumefaciens* por 5 a 10 min. Após isto, as folhas infectadas foram transferidas ao meio MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0,1 mg/L de

ácido naftalenoacético e 0,0059 g/L de acetoseringona) por 3 dias. Os discos infectados foram transferidos para meio seletivo (saís MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina).

As plantas que começaram a se desenvolver foram transferidas para meio MS com 200 mg/L de canamicina (**Figura 1**). As plantas enraizadas foram transferidas para o substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas em casa de vegetação sob condições normais até o florescimento e coleta de sementes.

Exemplo 5: ANÁLISES DA PRESENÇA DA SEQ ID NO: 1 EM PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A caracterização inicial das plantas enraizadas e transferidas para solo foi feita pelo ensaio histoquímico de GUS utilizando-se o substrato X-Gluc para a detecção do gene que codifica a proteína β -glucuronidase, presente no cassete de expressão inserido na planta.

Observou-se que um grande número de plantas apresentou forte coloração azul, as quais foram selecionadas para confirmação da integração do cassete de expressão contendo a SEQ ID NO: 1 por PCR, utilizando DNA genômico como molde.

Em seguida foi extraído DNA total de amostras de folha de plantas selvagens e plantas transgênicas. Para tal, coletaram-se cerca de 150 mg de folha, que foram macerados em microtubos de centrífuga com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bastante fino, ao qual acrescentaram-se 500 μ L de tampão de extração (Tris 100 mM pH=8.0, EDTA 50 mM pH=8.0, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) seguido da adição de 35 μ L de SDS 20%.

Em seguida, as amostras foram mantidas em banho-maria a 65°C por 10 minutos e 130 μ L de acetato de potássio 5 M foram adicionados. Os tubos foram

mantidos em gelo por 5 minutos e então centrifugados numa microcentrífuga a 15.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL contendo 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de sódio 3 M, misturado por inversão e incubado a -20°C por 10 minutos.

Na sequência, os tubos foram centrifugados a 15.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado nos próprios tubos com 1 mL de álcool 70%, por três vezes. Por último, foram adicionados 100 µL de água ultrapura acrescida de RNase A 100 mg/mL seguido de incubação à 37°C por 30 minutos. O DNA genômico foi armazenado a 4°C.

A presença da construção de DNA contendo a SEQ ID NO: 1 no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de tabaco foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) através da amplificação do gene *nptII*.

Inicialmente foram utilizados 1,0 µL de DNA, 0,5 µL dNTP (10 mM), 1,0 µL MgCl₂ (25 mM), 0,75 µL de “primer” direto (10 µM), 0,75 µL “primer” reverso (10 µM), 2,5 µL tampão Taq 10 x, 0,3 µL Taq polimerase (Fermentas, PAIS), 18,2 µL de água Milli-Q. Essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 10 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 65°C, 1 minuto à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos dessa reação foram visualizados em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídio, sob iluminação de luz ultra-violeta e, dentre as 6 amostras de plantas que apresentaram a coloração azul para o ensaio histoquímico de GUS, a presença do gene *nptII* foi confirmada em todas, sendo que uma planta negativa para GUS foi utilizada como controle negativo da reação de PCR (**Figura 2**). Essas plantas foram utilizadas nos ensaios posteriores para observar os efeitos da SEQ ID NO: 1 nas características das plantas de tabaco transgênicas.

Exemplo 6: ANÁLISE DOS EFEITOS DA SUSPENSÃO DE REGA NAS PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

A fim de verificar-se a resposta à suspensão de rega das plantas transgênicas em comparação com plantas selvagens foram utilizadas plantas de tabaco (geração T2) em que a homozigose do transgene foi verificada.

Para isso, sementes das linhagens homozigotas foram germinadas em placas de Petri contendo meio MS e, depois de cerca de 45 dias, as plantas foram transferidas para potes com 300 g de substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas sob condições normais de rega até atingirem 2 meses de idade. Esse procedimento foi realizado com plantas do tipo selvagem e com 3 linhagens de plantas transgênicas identificadas no **Exemplo 5**.

Plantas de dois meses de idade de três eventos de transformação independentes (denominados 4.5, 13.5 e 19.2) e também plantas selvagens com a mesma idade foram expostas a 1 ciclo de suspensão de rega por 9 dias seguido de 1 dia de reidratação. Em seguida, as plantas foram expostas a um novo ciclo de suspensão de rega por 15 dias seguido por 3 dias de reidratação.

O experimento foi realizado com 5 réplicas biológicas de cada linhagem (transgênicas ou selvagem) e o número de plantas sobreviventes foi contado (**Figura 3 A**).

A diferença entre o número de plantas que tiveram a capacidade de se recuperarem após o período de seca foi significativamente diferente entre as linhagens transgênicas e a selvagem. As linhagens transgênicas 4.5, 13.5 e 19.2 que contêm a SEQ ID NO: 1 apresentaram as taxas de sobrevivência ao período de seca de 100%, 100% e 80%, respectivamente, enquanto a linhagem não transformada apresenta uma

taxa de sobrevivência nula. A Figura 3B mostra uma planta sobrevivente (transgênica) de cada evento e uma planta não sobrevivente (selvagem).

Estes dados mostram que a inserção de uma sequência quimérica que contém a SEQ ID NO: 1 de cana-de-açúcar em plantas de tabaco aumentou a tolerância dessas plantas à seca.

Exemplo 7: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SALINO EM DISCOS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

Discos foliares de plantas de tabaco com 2 meses de idade e de 3 eventos transgênicos independentes (4.5, 13.5 e 19.2) que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens foram tratados com 1 mL de meio MS líquido meia força com 0, 200, 300 ou 400 mM de NaCl por 4 dias. O experimento foi realizado com 4 réplicas e após o período estresse salino procedeu-se a extração de clorofila através da maceração dos discos na presença de acetona seguida de sua quantificação como descrito por Arnon (1949) (**Arnon, D.I. (1949). Plant Physiology 24: 1-15**).

O estresse por NaCl causou uma redução no teor de clorofila em todas as plantas (Figura 4). No entanto, os dados mostraram que a retenção da clorofila nos discos foliares dos eventos transformados com a SEQ ID NO: 1 é significativamente maior do que nos discos originados de plantas selvagens, quando tratados com 300 e 400 mM de NaCl e que não há diferença significativa nos tratamentos sem estresse e com 200 mM de NaCl (**Figura 4**). Para a análise estatística foi aplicado o teste *t-Student*, sendo considerados como diferentes os valores que apresentaram um valor de $P < 0,05$.

Os dados acima descritos permitem concluir que plantas que receberam a inserção da SEQ ID NO: 1 apresentaram uma melhoria na tolerância ao estresse salino.

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

Para verificar os efeitos da suspensão de rega sobre os parâmetros fotossintéticos das plantas transgênicas em comparação com as plantas selvagens foram utilizadas plantas de tabaco (T2) em que a homozigose do transgene foi verificada.

Para isso, sementes das linhagens homozigotas foram germinadas e as plantas foram transferidas para potes com 300 g de substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas sob condições normais de rega até atingirem 2 meses de idade. Esse procedimento foi realizado com plantas do tipo selvagem e com plantas transgênicas identificadas no **Exemplo 5**.

Plantas de dois meses de idade de três eventos independentes (4.5, 13.5 e 19.2) e selvagens foram expostas a privação de rega por 9 dias seguido de 1 dia de reidratação. O experimento foi realizado com 5 réplicas biológicas de cada linhagem (transgênicas e selvagem) e os parâmetros fotossintéticos foram medidos a cada dois dias utilizando o equipamento IRGA (LCpro+; ADC Bioscientific, Reino Unido), numa concentração de CO₂ de 360 µL L⁻¹, intensidade de luz de 1000 µmol m⁻² s⁻¹, fluxo de gás 200 mL min⁻¹ e temperatura dentro da câmara de 25°C (**Guo Q, Zhang J, Gao Q, Xing S, Li F, et al. (2008) Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology 165: 1745-1755**).

Para estimar a condutância estomática de CO₂ (gs), taxa de transpiração (E) e fotossíntese (A), sob condições controle de estresse hídrico, foram utilizadas folhas completamente expandidas de três eventos independentes de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Os dados obtidos com as plantas transgênicas foram comparados com aqueles obtidos com as plantas selvagens através

da análise estatística pelo teste t-*Student* sendo considerado como diferentes os valores que apresentaram um valor de $P < 0,05$.

Todas as variáveis fisiológicas analisadas foram negativamente afetadas pelo estresse hídrico, tanto nas plantas selvagens como nas plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 (**Figuras 5, 6 e 11**). No entanto, as plantas transgênicas apresentaram melhor desempenho nas análises fisiológicas realizadas.

A partir do terceiro dia de estresse, a taxa de fotossíntese (A) nas plantas transgênicas contendo SEQ ID NO: 1, submetidas a estresse hídrico, foi menos afetada (**Figura 5**). Da mesma forma, tanto a condutância estomática (gs) (**Figura 6**) como a taxa de transpiração (E) (**Figura 11**) apresentaram um melhor desempenho a partir dos dias 7 e 3, respectivamente. Em resumo, foi observada uma clara diferença entre plantas transgênicas e selvagens em todos os parâmetros fotossintéticos avaliados em condições de seca.

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

EXEMPLO 9: EFEITOS DOS ESTRESSES SALINOS E HÍDRICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS QUE CONTÉM A SEQ ID NO: 1

Sementes de três eventos independentes de tabacos transgênicos que contém a SEQ ID NO: 1 e selvagens foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10% por 20 minutos seguidos de três lavagens com água Milli-Q autoclavada.

Dez sementes de cada genótipo foram esterilizadas superficialmente e inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo meio líquido Murashige-Skoog (MS) suplementado ou não com 100 mM de NaCl ou 150 mM de manitol, mantidos sob agitação constante de 90 rpm em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro ($300\text{-}400\text{ }\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. O experimento foi realizado em triplicata e após 20 dias avaliou-se o desempenho das plantas sob os diferentes tratamentos, através da análise visual e do peso fresco por planta.

O tratamento com NaCl não apresentou diferença significativa no peso fresco entre transgênicos e selvagens (**Figura 3A**). As plantas transgênicas que contém a SEQ ID NO: 1, quando expostas ao meio sem estresse mostraram peso fresco superior ao observado na linhagem não transformada (**Figura 3B**), o que sugere que em condições normais as plantas transgênicas possuem melhor desempenho em seu crescimento comparando-se com as plantas selvagens.

Eventos transgênicos portadores de SEQ ID NO: 1, quando expostos ao estresse hídrico por manitol apresentaram maior peso fresco por planta (**Figura 10C**), o que é reflexo do seu melhor desenvolvimento das partes aérea e radicular (**Figura 11B**). O padrão de desenvolvimento observado nas partes aéreas e radiculares das plantas de tabaco sob condições de estresse salino e manitol é apresentado nas **Figuras 11A e 11B**), respectivamente.

Os resultados descritos neste exemplo apresentam mais uma evidência de que as plantas transgênicas portadoras da SEQ ID NO: 1 possuem maior tolerância a seca comparando-se com as plantas selvagens.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de plantas geneticamente modificadas, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - a) Produção de um vetor que compreenda a sequência de nucleotídeos de interesse descrita em SEQ ID NO: 1;
 - b) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas;
 - c) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas;
 - d) Inserção do dito vetor compreendendo a sequência descrita em SEQ ID NO: 1, o promotor e o terminador no genoma de célula vegetal, planta ou partes de plantas.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** plantas geneticamente modificadas apresentarem no seu genoma a sequência gênica SEQ ID NO: 1.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** sequência gênica SEQ ID NO: 1 ser obtida de cana-de-açúcar.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledônias e em dicotiledônias.
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser aplicado em tabaco, cana-de-açúcar, soja, milho, arroz e trigo.
6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** permitir a integração do vetor no genoma da célula vegetal.
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** modular a tolerância da planta a estresses ambientais.

8. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** estresse ambiental ser preferencialmente seca e salinidade.
9. Vetor de DNA recombinante, **caracterizado por** compreender o vetor binário pCambia2301::H05, a sequência polinucleotídica descrita em SEQ ID NO: 1, promotor CamV35S, terminador do gene nopalina sintase (NOS), gene de seleção *nptII* e gene repórter *uidA*.
10. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 8 **caracterizado por** ser aplicado para produção de célula vegetal, semente, planta ou partes de planta.
11. Uso do vetor descrito na reivindicação de 9 **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledônias ou dicotiledônias para a produção de plantas transgênicas mais tolerantes a estresses ambientais.

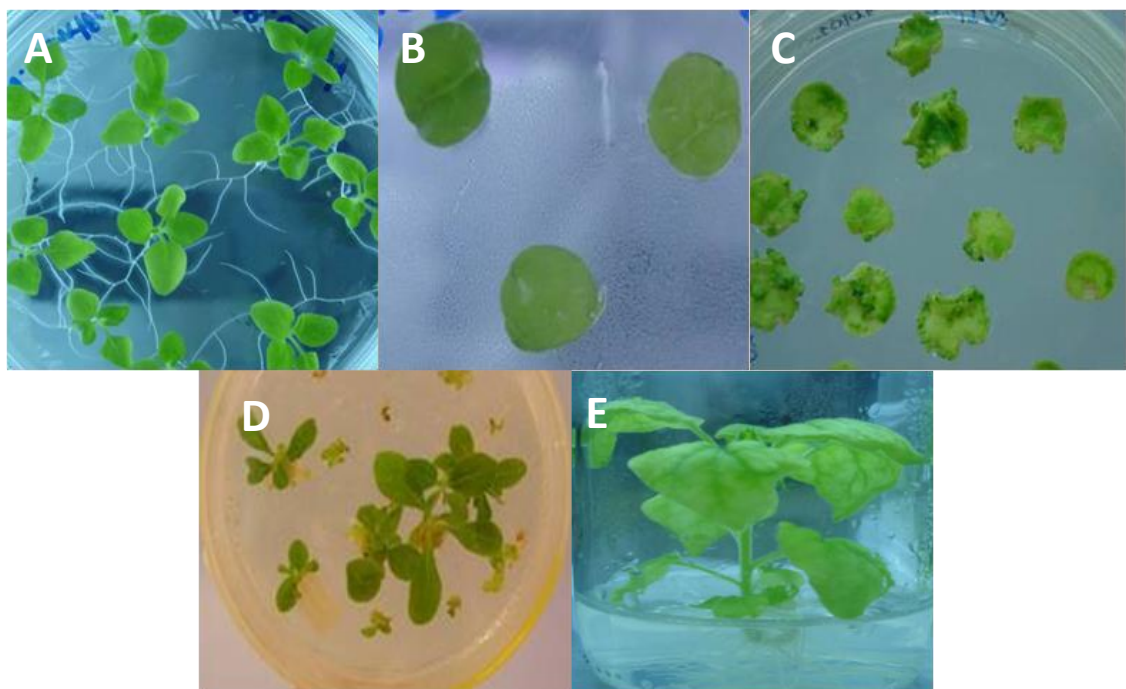


Figura 1

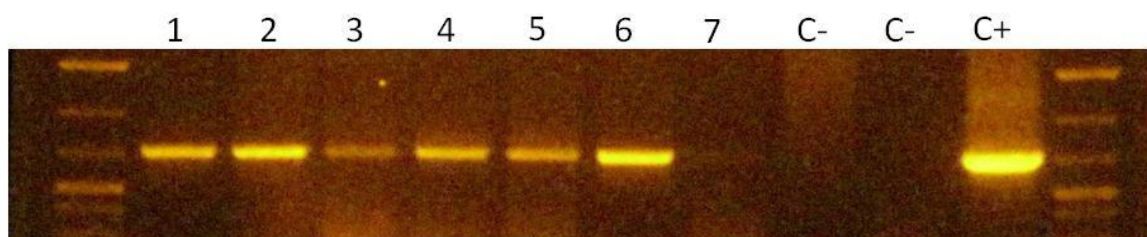
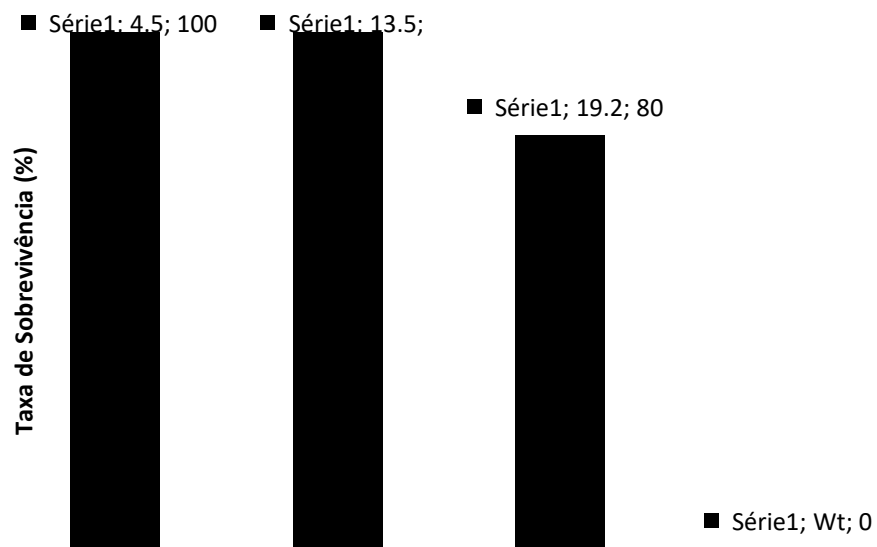


Figura 2

A



B



Figura 3

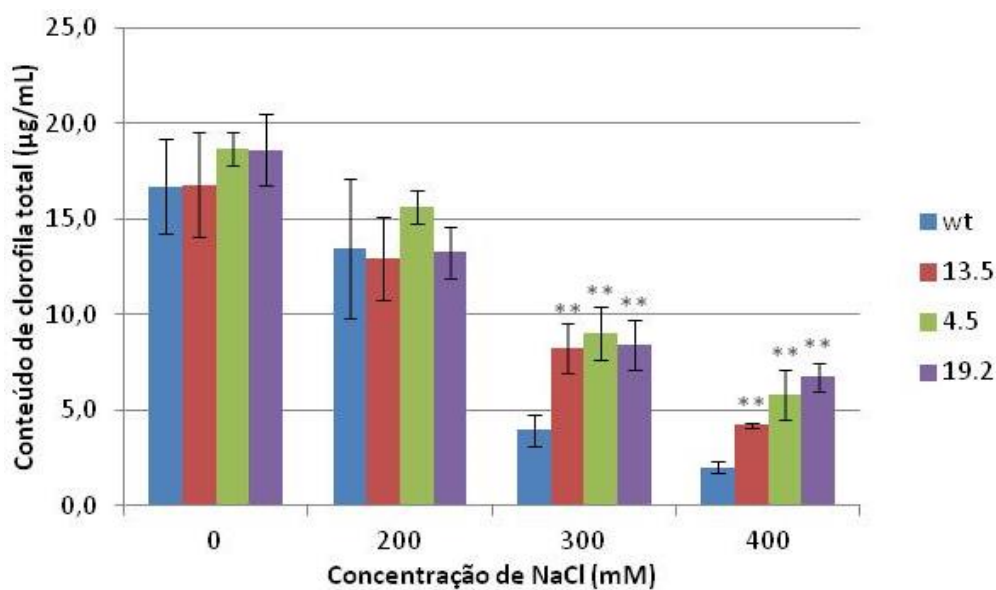


Figura 4

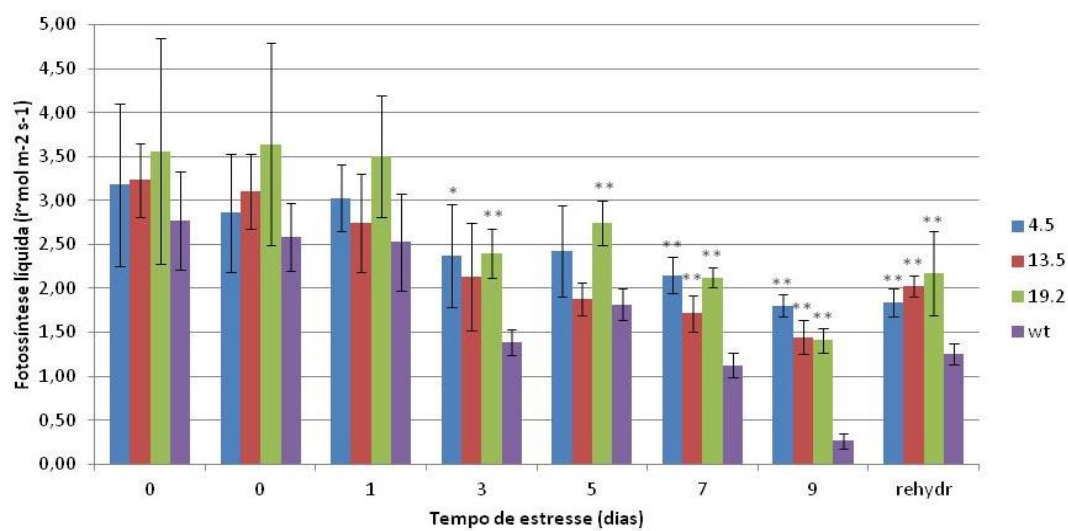


Figura 5

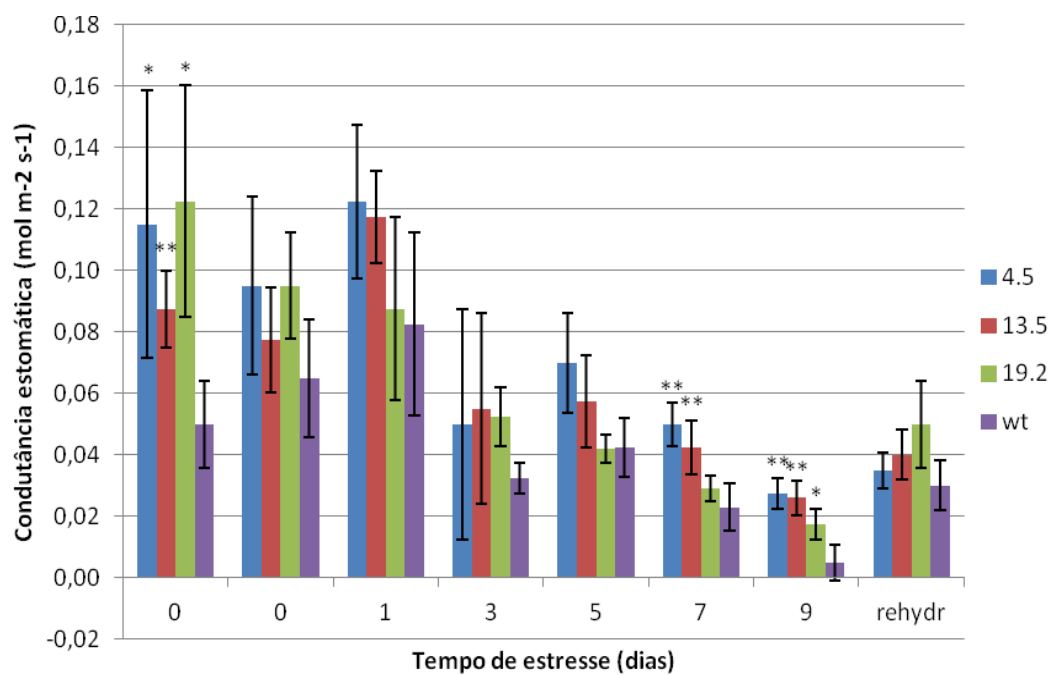


Figura 6

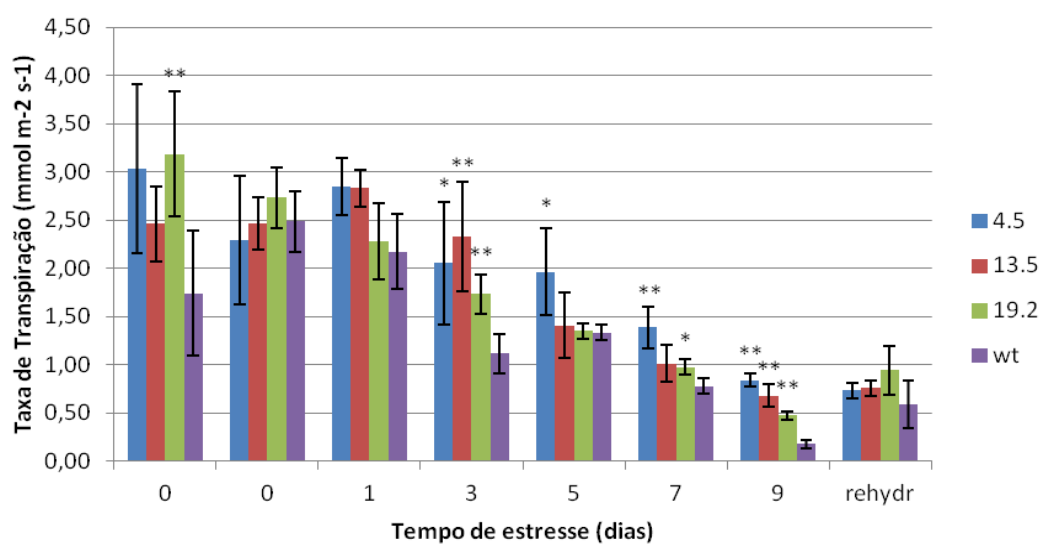
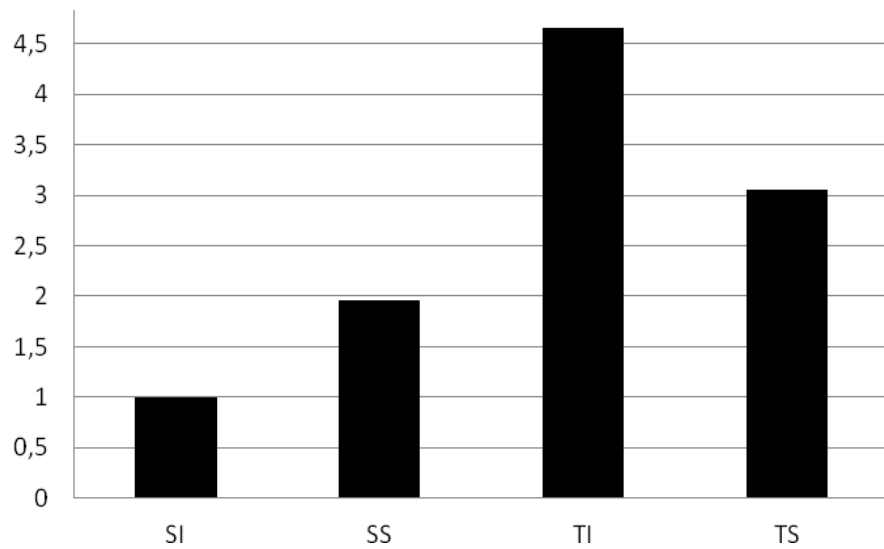


Figura 7

**Figura 8****Figura 9**

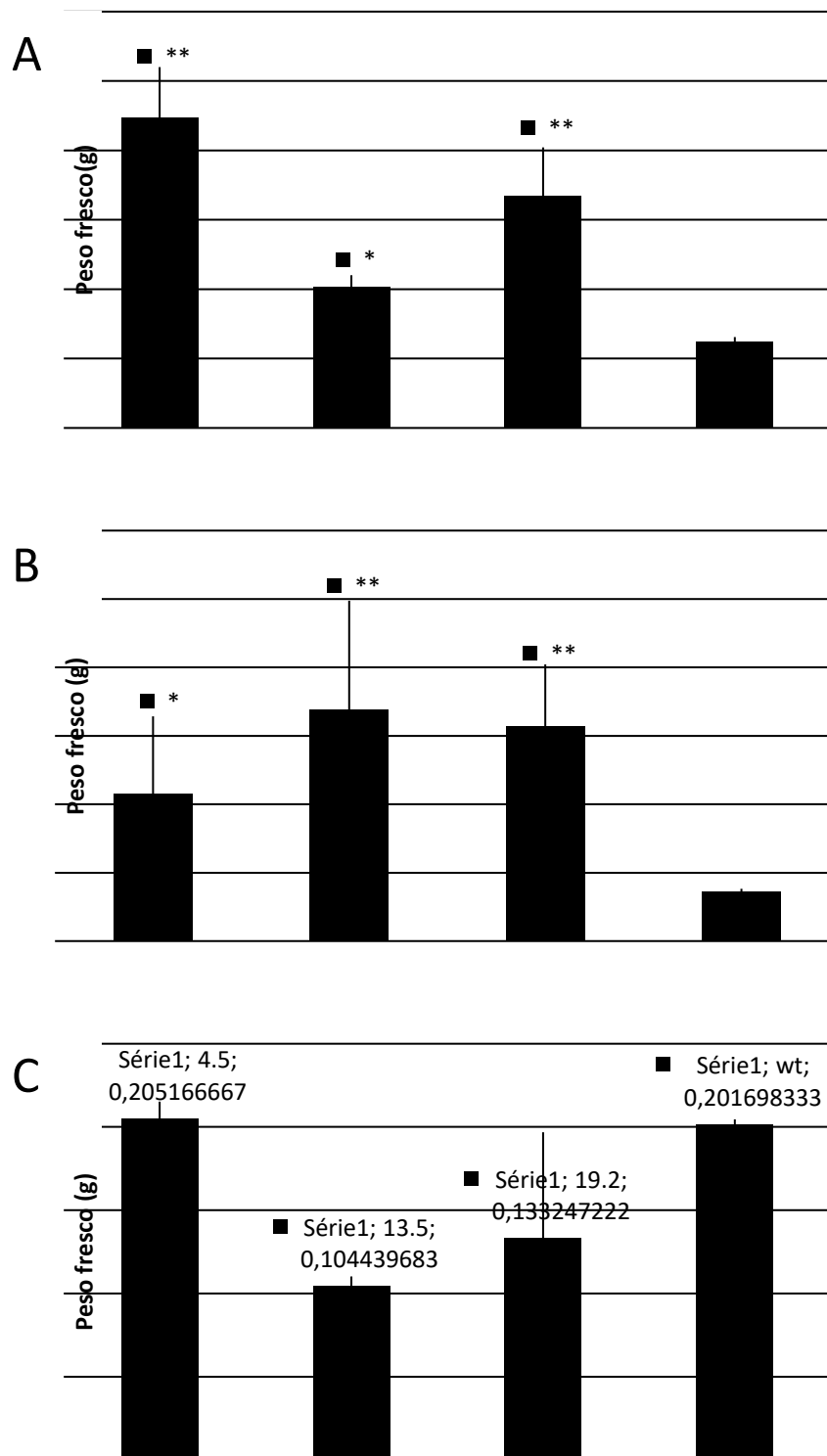


Figura 10

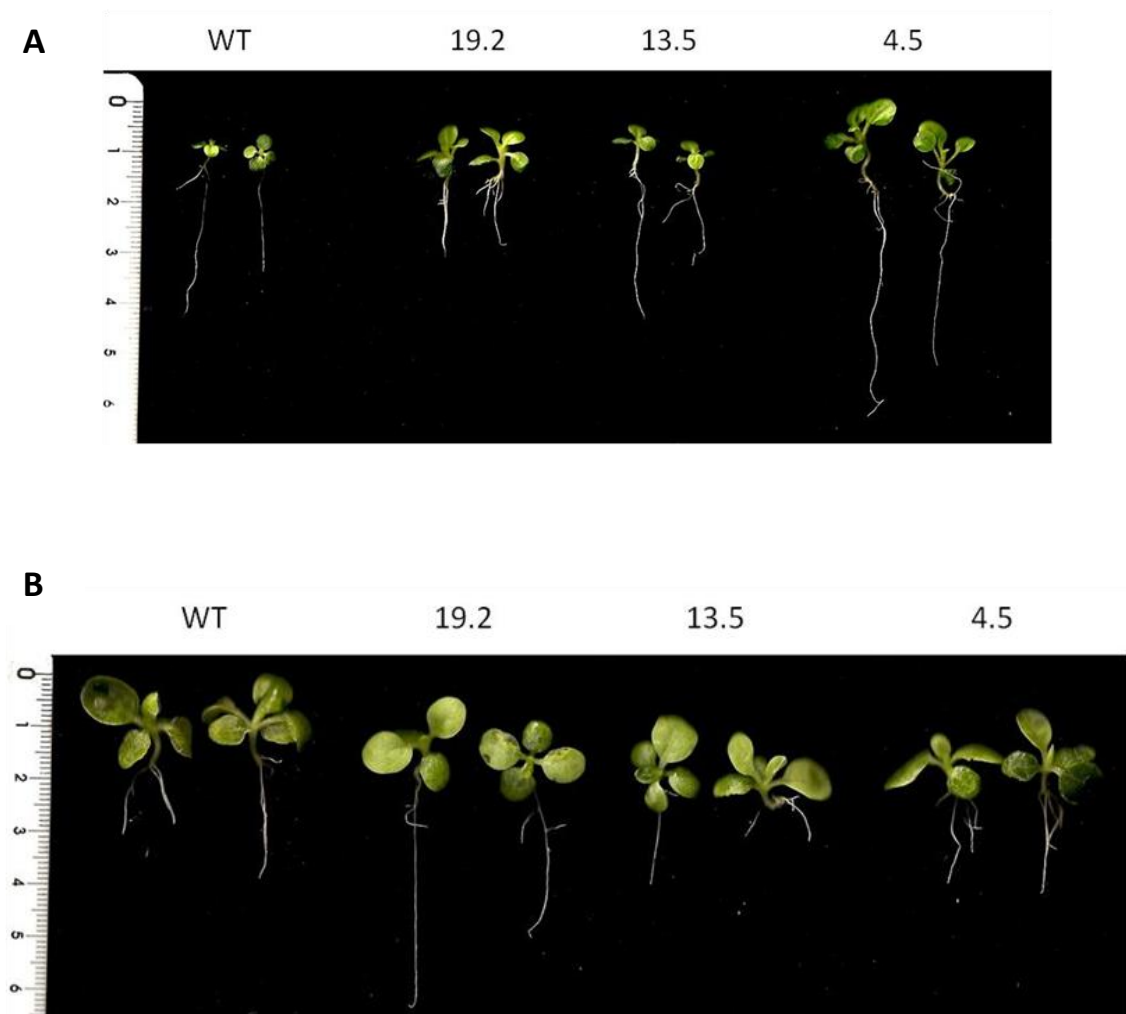


Figura 11