



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

(21) **PI0616523-0 A2**

(22) Data de Depósito: 15/08/2006
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82 2006.01
A01H 5/00 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO, CÉLULA DE PLANTA E POLIPEPTÍDEO ISOLADO**

(57) Resumo: MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO, CÉLULA DE PLANTA E POLIPEPTÍDEO ISOLADO. São fornecidas as sequências de polinucleotídeo e métodos para utilizar as mesmas de modo a aumentar a tolerância de uma planta aos estresses abióticos e ou aumentar a biomassa, vigor e/ou rendimento de uma planta.

(30) Prioridade Unionista: 15/08/2005 US 60/707,957

(73) Titular(es): Evogene Ltd.

(72) Inventor(es): Gil Ronen, Hagai Karchi, Larisa Rabinovich, Rodrigo Yelin

(74) Procurador(es): Tinoco Soares & Filho Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT IL2006000947 de 15/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/020638 de 22/02/2007

"MÉTODO PARA AUMENTAR A
TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA
AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA,
CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO, CÉLULA DE PLANTA E
5 POLIPEPTÍDEO ISOLADO"
CAMPO E HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos métodos para aumentar a tolerância ao estresse abiótico e/ou biomassa nas plantas e, mais especificamente, nas
10 plantas que expressam os genes de tolerância ao estresse abiótico exógeno.

As condições do estresse abiótico (também denominado como "estresse ambiental"), tais como, salinidade, seca, enchente, temperatura subideal e
15 poluição química tóxica, provocam dano substancial às plantas agrícolas. A maioria das plantas desenvolveu estratégias para se protegerem contra essas condições. Entretanto, se a gravidade e duração das condições de estresse forem muito grandes, os efeitos no desenvolvimento
20 da planta, crescimento e rendimento da maioria das plantas de safra são profundos. Além do mais, a maioria das plantas de safra são muito suscetíveis ao estresse abiótico (ABS) e, assim, necessitam de condições ideais de crescimento para rendimentos comerciais de safra. A exposição contínua ao
25 estresse provoca alterações principais no metabolismo da planta, o que finalmente leva à morte da célula e, conseqüentemente, perdas de rendimento. Assim, ao invés de pesquisa extensiva e a utilização de medidas sofisticadas e

intensivas para a proteção de colheitas, as perdas devido às condições de estresse abiótico permanecem em bilhões de dólares anualmente (1,2).

O seguinte resume as
5 implicações das condições exemplares do estresse abiótico.

Problemas associados com a
seca. Uma seca é um período de clima anormalmente seco que
persiste o tempo suficiente para produzir um desequilíbrio
hidrológico grave (por exemplo, dano à safra, deficiência de
10 abastecimento de água, etc.). Enquanto a maior parte do
clima que sentimos é breve e efêmero, a seca é um fenômeno
mais gradual, lentamente estabelecendo-se em uma área e
fortalecendo sua compreensão com o tempo. Nos casos graves,
a seca pode durar por muitos anos e pode ter efeitos
15 devastadores na agricultura e abastecimentos de água. Com
população em desenvolvimento e deficiência crônica de água
potável disponível, a seca não é somente o problema número
um relacionado ao clima na agricultura, ela também se
classifica como um dos principais desastres naturais de
20 todos os tempos, provocando não somente o dano econômico,
porém também perda de vidas humanas. Por exemplo, as perdas
da seca dos Estados Unidos de 1988 excederam \$40 bilhões,
excedendo as perdas provocadas pelo Furação Andrew em 1992,
pelas as enchentes do Rio Mississippi de 1993 e pelo o
25 terremoto de São Francisco em 1989. Em algumas áreas do
mundo, os efeitos da seca podem ser muito mais graves. No
Chifre da África, a seca de 1984-1985 precedeu a fome que
matou 750.000 pessoas.

Os problemas para as plantas provocados por baixa disponibilidade de água incluem os estresses mecânicos provocados pela retirada de água celular. A seca também faz com que as plantas tornem-se mais suscetíveis a diversos desastres (Simpson (1981). "O Valor do Conhecimento Fisiológico do Estresse da Água nas Plantas", Em Estresse de Água nas Plantas, (Simpson, G. M., ed.), Praeger, N.Y., pp. 235-265).

Além de muitas regiões de terra do mundo que são muito áridas para a maioria, se não todas, as plantas de safra, o uso exagerado e utilização exagerada da água disponível é resultante em uma perda crescente do terreno utilizado para agricultura, um processo que, no extremo, resulta em desertificação. O problema é ainda composto pelo acúmulo crescente de sal nos solos, conforme acima descrito, o que adiciona à perda da água disponível nos solos.

Problemas associados com altos níveis de sal. Um em cada cinco hectares de terreno irrigado é danificado pelo sal, um fator histórico importante no declínio das sociedades agrárias antigas. Espera-se que essa condição somente piore, ainda reduzindo a disponibilidade de terreno arável e produção de safra, considerando que nenhuma das cinco safras alimentícias principais - trigo, milho, arroz, batata e soja - pode tolerar o sal em excesso.

Os efeitos prejudiciais do sal nas plantas são consequências do déficit de água resultante em estresse osmótico (semelhante ao estresse da seca) e os

efeitos dos íons de sódio em excesso nos processos bioquímicos críticos. Assim como o frio e a seca, a salina alta provoca déficit de água; a presença de alto sal torna difícil para as raízes de planta extraírem a água de seu ambiente (Buchanan et al. (2000) em Bioquímica e Biologia Molecular das Plantas, Sociedade Norte-Americana de Fisiologistas de Planta, Rockville, Md.). A salinidade do solo é assim uma das variáveis mais importantes que determinam onde uma planta pode florescer. Em muitas partes do mundo, as áreas de terreno relativamente grandes não são cultiváveis devido à salinidade de solo naturalmente alta. Para compor o problema, a salinação dos solos que são utilizados para a produção agrícola é um problema significativo e crescente nas regiões que dependem expressivamente na agricultura. O último é composto pela utilização excessiva, fertilização excessiva e deficiência de água, tipicamente provocadas pela alteração climática e pelas demandas da população em crescimento. A tolerância ao sal é de importância específica no início do ciclo de vida da planta, considerando que a evaporação da superfície do solo provoca o movimento ascendente da água, e o sal acumula-se na camada superior do solo em que as sementes são colocadas. Assim, a germinação normalmente ocorre em uma concentração de sal muito mais alta do que o nível médio de sal em todo o perfil do solo.

Problemas associados com calor excessivo. A germinação de muitas safras é muito sensível à temperatura. Um gene que melhoraria a germinação em

condições de calor seria útil para as safras que são plantadas no final da temporada ou em climas quentes. As mudas e as planta maduras que são expostas ao calor excessivo podem sofrer choque de calor, o que pode surgir em

5 diversos órgãos, incluindo nas folhas e especificamente na fruta, quando a transpiração é insuficiente para superar o estresse de calor. O calor também danifica as estruturas celulares, incluindo organelas e citoesqueleto, e prejudica a função de membrana [Buchanan et al. (2000) em Bioquímica e

10 Biologia Molecular das Plantas, Sociedade Norte-Americana de Fisiologistas de Planta, Rockville, Md. O choque de calor pode produzir uma diminuição na síntese geral de proteína, acompanhada pela expressão das proteínas de choque de calor. As proteínas de choque de calor atuam como acompanhantes e

15 estão envolvidas no novo enovelamento de proteínas desnaturadas pelo calor.

O estresse de calor freqüentemente acompanha as condições de baixa disponibilidade da água. O próprio calor é visto como um

20 estresse de interação e adiciona aos efeitos prejudiciais provocados pelas condições de déficit da água. A demanda evaporativa exibe aumentos exponenciais próximos com aumentos nas temperaturas de dia e podem resultar em altas taxas de transpiração e baixos potenciais de água da planta

25 [Hall et al. (2000) Fisiol. de Planta 123: 1449-1458]. O dano de alta temperatura ao pólen quase nunca ocorre em conjunto com o estresse da seca, e raramente ocorre sob condições com água suficiente. Dessa forma, a separação dos

efeitos do calor e estresse da seca sobre a polinização é difícil. O estresse combinado pode alterar o metabolismo da planta de modos novos; portanto, o entendimento da interação entre os estresses diferentes pode ser importante para o desenvolvimento das estratégias de modo a otimizar a tolerância ao estresse através de manipulação genética.

Problemas associados com condições de frio em excesso. O termo "sensibilidade ao resfriamento" foi utilizado para descrever muitos tipos de dano fisiológico produzido em baixas temperaturas, porém acima de congelamento. A maioria das safras de origens tropicais, tais como, soja, arroz, milho e algodão, é facilmente danificada pelo resfriamento. O dano de resfriamento típico inclui definhamento, necrose, clorose ou vazamento de íons a partir das membranas de célula. Os mecanismos subjacentes da sensibilidade ao resfriamento ainda não são completamente entendidos, porém provavelmente envolvem o nível de saturação da membrana e outras deficiências fisiológicas. Por exemplo, a fotoinibição da fotossíntese (interrupção da fotossíntese devido às altas intensidades de luz) freqüentemente ocorre sob as condições atmosféricas limpas subseqüentes às noites frias de fim do verão/outono. Por exemplo, o resfriamento pode preceder as perdas de rendimento e baixa qualidade do produto através da maturação atrasada do milho. Outra consequência do crescimento deficiente é a proteção um tanto deficiente da terra dos campos de milho na primavera, freqüentemente resultando em erosão do solo, ocorrência crescente de ervas

daninhas e absorção reduzida de nutrientes. Uma absorção com atraso do nitrogênio de mineral também poderia preceder as perdas crescentes de nitrato no lençol aquático. Através de algumas estimativas, o resfriamento contabiliza as perdas monetárias nos Estados Unidos (EUA) somente através da seca e inundação.

O déficit de água é um componente comum de muitos estresses de planta. O déficit de água ocorre nas células da planta quando toda a taxa de transpiração da planta excede a absorção da água. Além da seca, outros estresses, tais como salinidade e baixa temperatura, produzem a desidratação celular (McCue e Hanson (1990) Biotecnologia de Tendências 8: 358-362).

A transdução do sinal de estresse de seca e sal consiste em vias de sinalização de homeostase iônica e osmótica. O aspecto iônico do estresse de sal é sinalizado através da via SOS em que um complexo de quinase de proteína SOS3-SOS2 responsivo ao cálcio controla a expressão e atividade dos transportadores de íon, tais como, SOS1. A via que regula a homeostase do íon em resposta ao estresse de sal foi revisada recentemente por Xiong e Zhu (2002) Ambiente da Célula de Planta 25: 131-139.

O componente osmótico do estresse de sal envolve as reações complexas de planta que se sobrepõem com as respostas de seca e/ou estresse de frio.

Os aspectos comuns da resposta de seca, frio e estresse de sal foram revisados recentemente por Xiong e Zhu (2002) supra). Tais incluem:

- (a) alterações transitórias nos níveis de cálcio citoplásmico muito cedo no evento de sinalização (Knight, (2000) Int. Rev. Cytol. 195: 269-324; Sanders et al. (1999) Célula de Planta 11: 691-706);
- 5 (b) transdução de sinal através de quinases de proteína dependente de cálcio e/ou ativadas por mitógeno (CDPKs; vide Xiong et al., 2002) e fosfatase de proteína (Merlot et al. (2001) J. de Planta 25: 295-303; Tahtiharju e Palva (2001) J. de Planta 26: 461-470);
- 10 (c) aumentos nos níveis de ácido abscísico em resposta ao estresse iniciando um subsistema de respostas (Xiong et al. (2002) supra, e referências lá contidas);
- (d) fosfatos de inositol como moléculas de sinal (pelo menos para um subsistema das alterações de transcrição responsivas
- 15 ao estresse (Xiong et al. (2001) Dev. de Genes 15: 1971-1984);
- (e) ativação de fosfolipases que, por sua vez, geram um arranjo diverso de segundas moléculas mensageiras, algumas das quais poderiam regular a atividade das quinases
- 20 responsivas ao estresse (funções da fosfolipase D em uma via independente ABA, Frank et al. (2000) Célula da planta 12: 111-124);
- (f) indução de genes do tipo abundante de embriogênese (LEA), incluindo os genes de COR/RD responsivos a CRT/DRE
- 25 (Xiong e Zhu (2002) supra);
- (g) níveis crescentes de antioxidantes e osmólitos compatíveis, tais como, prolina e açúcares solúveis (Hasegawa et al. (2000) Rev. An. de Fisiol. de Planta Mol.

de Planta 51: 463-499); e [0028] (h) acúmulo de espécies de oxigênio reativo, tais como, superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila (Hasegawa et al. (2000) supra).

5 A biossíntese de ácido abscísico é regulada pelo estresse osmótico em etapas múltiplas. Tanto a sinalização de estresse osmótico independente de ABA quanto o independente primeiro modifica constitutivamente os fatores de transcrição expressos,
10 levando à expressão dos ativadores de transcrição de resposta prematura, que então ativa os genes causadores de tolerância ao estresse ajusante.

Com base na semelhança de muitos aspectos das respostas de frio, seca e estresse de sal, pode ser concluído que os genes que aumentam a tolerância ao frio ou estresse de sal também podem melhorar a proteção ao estresse da seca. De fato, isso já foi demonstrado para os fatores de transcrição (no caso de AtCBF/DREB1) e para outros genes, tais como OsCDPK7 (Saijo et al. (2000) J. de Planta 23: 319-327), ou AVP1 (um próton de pirofosfatase vacuolar-- bomba, Gaxiola et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11444-11449).

O desenvolvimento das plantas tolerantes ao estresse é uma estratégia que possui o potencial para resolver ou mediar pelo menos alguns desses problemas. Entretanto, as estratégias adicionais de criação de planta utilizadas para desenvolver novas linhas de plantas que exibem tolerância a ABS são relativamente

ineficientes, considerando que são monótonas, demoradas e de resultado imprevisto. Além do mais, os recursos limitados de germoplasma para tolerância ao estresse e incompatibilidade em cruzamentos entre espécies de planta remotamente relacionadas representam os problemas significativos deparados na criação convencional. Adicionalmente, os processos celulares que precedem a tolerância de ABS são complexos por natureza e envolvem múltiplos mecanismos de adaptação celular e numerosas vias metabólicas (4-7).

Os esforços da engenharia genética, com o objetivo de conferir tolerância ao estresse abiótico às safras transgênicas, foram descritos na técnica anterior. Os estudos por Apse e Blumwald (Biotechnol. de Opin. Atual 13:146-150, 2002), Quesada et al. (Fisiol. de Planta. 130:951-963, 2002), Holmström et al. (Natureza 379: 683-684, 1996), Xu et al. (Fisiol. de Planta 110: 249-257, 1996), Pilon-Smits e Ebskamp (Fisiol. de Planta 107: 125-130, 1995) e Tarczynski et al. (Ciência 259: 508-510, 1993), todos tentaram gerar as plantas tolerantes ao estresse.

Além disso, diversas patentes de patente e patentes norte-americanas também descrevem os polinucleotídeos associados com a tolerância ao estresse e sua utilização na geração de plantas tolerantes ao estresse. As Patentes dos EUA N°s 5.296.462 e 5.356.816 descrevem a transformação de plantas com os polinucleotídeos codificando as proteínas envolvidas na adaptação a frio de *Arabidopsis thaliana*, para assim promover a tolerância ao frio nas plantas transformadas.

A Pat. dos EUA N° 6.670.528 descreve a transformação de plantas com os polinucleotídeos codificando os polipeptídeos aglutinantes aos elementos responsivos ao estresse, para assim promover a tolerância das plantas transformadas ao estresse abiótico.

A Pat. dos EUA N° 6.720.477 descreve a transformação de plantas com polinucleotídeo codificando uma proteína relacionada ao estresse de transdução do sinal, capaz de aumentar a tolerância das plantas transformadas ao estresse abiótico.

Os Pedidos dos EUA N°s de Série 09/938842 e 10/342224 descrevem os genes relacionados ao estresse abiótico e sua utilização ao conferir às plantas a tolerância ao estresse abiótico.

O Pedido dos EUA N° de Série 10/231035 descreve a expressão excedente de uma sulfurase de co-fator de molibdênio nas plantas para assim aumentar sua tolerância ao estresse abiótico.

Embora os estudos acima descritos tenham sido pelo menos parcialmente bem-sucedidos na geração de plantas tolerantes ao estresse, ainda existe uma necessidade para os genes tolerantes ao estresse que podem ser utilizados para gerar as plantas tolerantes de uma ampla faixa de condições de estresse abiótico.

Ao reduzir a presente invenção para prática, os presentes inventores identificaram, através de estudos de bioinformática e laboratoriais, diversos novos genes de tolerância ao estresse abiótico, que podem ser

utilizados para aumentar a tolerância ao estresse abiótico e/ou biomassa, vigor e rendimento nas plantas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a tolerância de uma planta a um estresse abiótico, compreendendo a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-119, 139-154 OU 155, assim aumentando a tolerância da planta ao estresse abiótico.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o estresse abiótico é selecionado a partir do grupo consistindo em salinidade, privação de água, baixa temperatura, alta temperatura, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutriente, excesso de nutriente, poluição atmosférica e irradiação UV.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a biomassa, vigor e/ou rendimento de uma planta, compreendendo a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-119, 139-154 ou 155, assim aumentando biomassa, vigor e/ou rendimento da planta.

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

- 5 (a) transformação de uma célula da planta com o polinucleotídeo exógeno;
- (b) geração de uma planta madura a partir da célula; e
- (c) cultura da planta madura sob condições adequadas para expressar o polinucleotídeo exógeno dentro da planta madura.

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

De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é fornecido uma construção de ácido nucléico, compreendendo uma sequência de ácido
20 nucléico pelo menos 90 % idêntica a uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 156, 157, 158, 159, 160-202, 204-209, 212-285 e um promotor capaz de
25 instruir a transcrição da sequência de ácido nucléico em uma célula hospedeira.

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

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

5 De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, o promotor constitutivo é o promotor de At6669.

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

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

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

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

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

25 De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado, compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à sequência de aminoácido codificada por

um polinucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 156, 157, 158, 159, 160-202, 204-209, 212-285.

De acordo com características adicionais nas configurações preferidas descritas, a sequência de aminoácido é pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-121, 141-156 ou 157.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecida uma célula da planta compreendendo um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-119, 139-154 ou 155, assim aumentando a tolerância da planta ao estresse abiótico.

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

A presente invenção trata de forma bem-sucedida das falhas das configurações atualmente conhecidas ao fornecer os métodos para utilizar os novos genes de tolerância ao estresse abiótico de modo a aumentar a tolerância de plantas ao estresse abiótico e/ou biomassa.

Exceto se de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem os mesmos significados conforme comumente entendidos por aqueles com habilidade na técnica aos quais esta invenção pertence. Embora os métodos e materiais

semelhantes ou equivalentes àqueles descritos no presente possam ser utilizados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais adequados são descritos abaixo. No caso de conflito, a especificação de patente, 5 incluindo as definições, controlará. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não têm a intenção de serem limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção é aqui descrita, 10 somente através de exemplo, com referência aos desenhos anexos. Com referência específica agora aos desenhos em detalhes, é enfatizado que os detalhes demonstrados são para exemplo e para fins de discussão ilustrativa somente das configurações preferidas da presente invenção, e são 15 apresentados de modo a fornecer o que é acreditado como sendo a descrição mais útil e prontamente entendida dos princípios e aspectos conceituais da invenção. Com relação a isso, nenhuma tentativa é feita para demonstrar os detalhes estruturais da invenção em mais detalhes do que necessário 20 para um entendimento fundamental da invenção, a descrição tomada com os desenhos torna aparente para aqueles com habilidade na técnica como as diversas formas da invenção podem ser configuradas na prática.

a figura 1 uma ilustração esquemática da metodologia 25 utilizada para medir o tamanho das plantas. As fotos digitais são tiradas utilizando iluminação uniforme e um tripé ajustado em uma distância constante. As fotos digitais obtidas são

processadas utilizando um filtro "com base verde" "que remove as "partes não verdes" da foto, deixando somente a área de roseta da planta para quantificação. Após a quantificação da área de roseta, os resultados são exportados a uma planilha eletrônica e analisados utilizando software estatístico;

as figuras 2A-B são os resultados representativos de um gene (SEQ ID 156) que confere a tolerância ao estresse abiótico descoberta de acordo com os ensinamentos da presente invenção;

a figura 2A o crescimento das plantas sob condição não estressantes por 7-10 dias foi transferido às altas condições osmóticas e seu crescimento foi seguido por 12 dias utilizando formação de imagem digital. As imagens processadas das fotos tiradas no Dia 0, Dia 5 e Dia 12 são mostradas. Observe as plantas de controle no centro superior de cada prato e os eventos transgênicos independentes envolvendo as plantas de controle; e

a figura 2B é um gráfico que descreve o crescimento de área da planta como uma função do tempo utilizando as imagens mostradas no painel A. Quatro dos cinco eventos mostrados são capazes de crescer significativamente mais rápido do que as plantas de controle do tipo selvagem sob as mesmas condições. A análise estatística dos resultados é mostrada abaixo na Tabela 5 linhas 1-5.

DESCRIÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES PREFERIDAS

A presente invenção é de métodos para aumentar a tolerância de plantas ao estresse abiótico e/ou biomassa ao utilizar os novos genes de tolerância ao estresse abiótico e de plantas que exibem a tolerância aumentada às condições de estresse e/ou capacidade aumentada para acumular a biomassa.

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

Antes de explicar pelo menos uma configuração da invenção em detalhes, deve ser entendido que a invenção não é limitada em sua aplicação aos detalhes de construção e disposição dos componentes, estabelecidos na seguinte descrição ou ilustrados nos desenhos. A invenção é capaz de outras configurações ou de ser praticada ou realizada em diversos modos. Da mesma forma, deve ser entendido que a fraseologia e terminologia aqui utilizadas são para fins de descrição e não devem ser consideradas como limitantes.

Ao reduzir a presente invenção para prática, os presentes inventores, ao utilizar as técnicas de bioinformática, identificaram as seqüências de polinucleotídeo que codificam as supostas proteínas de tolerância ao estresse abiótico (ABST) (Exemplo 1). As seqüências selecionadas foram isoladas (Exemplo 2), clonadas em vetores de expressão (Exemplo 3-4) e introduzidas nas plantas *Arabidopsis thaliana* (Exemplo 5-6). Essas plantas

foram cultivadas sob condições de estresse de salinidade, ou sob condições normais, e verificadas para biomassa aumentada conforme comparado com as plantas de controle semelhantes que não transportam os genes de ABST exógenos. Conforme é evidente a partir dos resultados mostrados no Exemplo 8, as seqüências de ácido nucléico selecionadas de acordo com os ensinamentos da presente invenção foram mostradas para melhorar a tolerância de plantas transgênicas lá transfectadas ao estresse abiótico conforme comparado com as plantas de controle.

Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a tolerância de uma planta a um estresse abiótico e/ou biomassa da planta. O método inclui a expressão dentro da de um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-119, 139-154 ou 155.

De acordo com uma configuração

20 preferida desse aspecto da presente invenção, o polinucleotídeo isolado é conforme estabelecido na SEQ ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 156, 157, 158, 159, 160-202, 204-209, 212-285.

Alternativamente, o

25 polinucleotídeo exógeno da presente invenção codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido conforme ainda descrito abaixo, 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 %, ou 100 %, ou qualquer intervalo entre quaisquer dois desses valores.

pelo menos cerca de 82 %, pelo menos cerca de 83 %, pelo menos cerca de 84 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 86 %, pelo menos cerca de 87 %, pelo menos cerca de 88 %, pelo menos cerca de 89 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 91 %, pelo menos cerca de 92 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, pelo menos cerca de 99 %, ou mais, digamos, 100 % homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-119, 139-154 ou 155.

A frase "estresse abiótico" aqui utilizada refere-se a qualquer efeito adverso no metabolismo, crescimento, reprodução e/ou viabilidade de uma planta. De forma correspondente, o estresse abiótico pode ser induzido pelas condições de crescimentos ambientais subideais, tais como, por exemplo, salinidade, privação de água, inundação, resfriamento, baixa ou alta temperatura, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutriente, poluição atmosférica ou irradiação UV. As implicações do estresse abiótico são discutidas na seção de Histórico.

A frase "tolerância ao estresse abiótico" conforme aqui utilizada refere-se a capacidade de uma planta de resistir a um estresse abiótico sem sofrer uma alteração substancial no metabolismo, crescimento, produtividade e/ou viabilidade.

Preferivelmente, as plantas por engenharia genética da presente invenção exibem pelo menos cerca de mais 2%, mais 5%, mais 10 %, mais 20 %, mais 30 %, mais 40 %, mais 50 %, mais 60 %, mais 70 %, mais 80 %, mais 90 % ou tolerância mesmo mais alta ao estresse abiótico do que as plantas não transgênicas.

Conforme aqui utilizado, o termo "polinucleotídeo exógeno" refere-se a uma sequência de ácido nucléico que não naturalmente expresso dentro da planta, porém que, quando introduzida na planta de uma forma estável ou transitória, produz pelo menos um produto de polipeptídeo.

A homologia (p.ex., homologia de porcentagem) pode ser determinada utilizando qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, o software BlastP do Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (NCBI), tal como, através da utilização de parâmetros padrões.

A identidade (p.ex., homologia de porcentagem) pode ser determinada utilizando qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, o software BlastN do Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (NCBI) tal como, através da utilização de parâmetros padrões.

O polinucleotídeo da presente invenção refere-se a uma única ou dupla sequência de ácido nucléico de fita dupla que é isolada e fornecida na forma de uma sequência de RNA, uma sequência complementar de

polinucleotídeo (cDNA), uma sequência de polinucleotídeo genômico e/ou uma sequência de polinucleotídeo composto (p.ex., uma combinação do acima).

Conforme aqui utilizada, a
5 frase "sequência de polinucleotídeo complementar" refere-se a uma sequência, que resulta da transcrição reversa do RNA mensageiro utilizando uma transcriptase reversa ou qualquer outra polimerase de DNA dependente de RNA. Tal sequência pode ser subsequentemente amplificada in vivo ou in vitro
10 utilizando uma Polimerase de DNA dependente de RNA.

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

15 Conforme aqui utilizado, a frase "sequência de polinucleotídeo composto" refere-se a uma sequência, que é pelo menos parcialmente complementar e pelo menos parcialmente genômica. Uma sequência composta pode incluir algumas sequências de éxons exigidas para
20 codificar o polipeptídeo da presente invenção, bem como algumas sequências intrônicas interpondo-se entre elas. As sequências intrônicas podem ser de qualquer fonte, incluindo de outros genes, e tipicamente incluirão as sequências de sinal de splicing conservadas. Tais sequências intrônicas
25 podem ainda incluir os elementos regulatórios da expressão da atuação de cis.

As sequências de ácido nucléico dos polipeptídeos da presente invenção poderão ser otimizadas

para expressão. Tais seqüências otimizadas são fornecidas em
SEQ ID N°s: 156, 157, 158 e 159. Os exemplos de tais
modificações de seqüência incluem, porém não são limitados
a, um teor de G/C alterado para aproximar-se mais daquele
5 tipicamente encontrado nas espécies de planta de interesse,
e a remoção de códons atipicamente encontrada nas espécies
de planta comumente denominadas como otimização de códon.

A frase "otimização de códon"
refere-se a seleção dos nucleotídeos apropriados de DNA para
10 utilização dentro de um gene estrutural ou seu fragmento que
se aproxima da utilização do códon dentro da planta de
interesse. Portanto, um gene ou seqüência de ácido nucléico
otimizado refere-se a um gene em que a seqüência de
nucleotídeo de um gene naturalmente ocorrente ou nativo
15 tenham sido modificado com a finalidade de utilizar os
códons preferidos estatisticamente ou favorecidos
estatisticamente dentro da planta. A seqüência de
nucleotídeo tipicamente é examinada no nível de DNA e a
região de codificação otimizada para expressão nas espécies
20 de planta determinadas utilizando qualquer procedimento
adequado, por exemplo, conforme descrito em Sardana et al.
(1996, Relatórios de célula da planta 15:677-681). Nesse
método, o desvio padrão da utilização do códon, uma medição
da influência de utilização do códon, podem ser calculados
25 ao primeiro encontrar o desvio proporcional quadrado de
utilização de cada códon do gene nativo relativo aquele dos
genes de planta altamente expressos, seguido por um cálculo
do desvio quadrado médio. A fórmula utilizada é: $1 \text{ SDCU} = n$

= $1/N \left[(X_n - Y_n) / Y_n \right]^2 / N$, em que X_n refere-se a frequência de utilização do códon n nos genes de planta altamente expressos, em que Y_n à frequência de utilização do códon n no gene de interesse e N refere-se ao número total de códons no gene de interesse. Uma tabela da utilização do códon a partir de genes altamente expressos das plantas dicotiledôneas é compilada utilizando os dados de Murray et al. (1989, Nuc Acids Res. 17:477-498).

Um método para otimizar a sequência de ácido nucléico em conformidade com a utilização preferida do códon para o tipo de célula específica da planta é com base no uso direto, sem realização de quaisquer cálculos estatísticos extras, das tabelas de otimização de códon, tais como aquelas fornecidas on-line no Banco de Dados de Utilização do Códon através do banco de DNA NIAS (Instituto Nacional de Ciências Agro-biológicas) no Japão (<http://www.kazusa.ou.jp/codon/>). 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 em Genbank.

Ao utilizar as tabelas acima de modo a determinar os códons mais preferidos ou mais favorecidos para cada aminoácido em uma espécie particular (por exemplo, arroz), uma sequência de nucleotídeo naturalmente ocorrente codificando uma proteína de interesse pode ser o códon otimizado para tais espécies de planta específicas. Isso é efetuado ao substituir os códons que

possam ter uma baixa incidência estatística no genoma específica da espécie com os códons correspondentes, com relação a um aminoácido, que são estatisticamente mais favorecidos. Entretanto, um ou mais códons menos favorecidos
5 podem ser selecionados para excluir os locais existentes de restrição, para criar novos em junções potencialmente úteis (extremidades 5' e 3' para adicional o peptídeo de sinal ou cassetes de terminação, locais internos que poderiam ser utilizados para cortar e unir os segmentos juntos para
10 produzir uma sequência correta e comprimento total), ou para eliminar as sequências de nucleotídeo que podem negativamente afetar a estabilidade ou expressão do mRNA.

A sequência de codificação do nucleotídeo naturalmente ocorrente também pode, antes de
15 qualquer modificação, conter um número de códons que correspondem a um códon estatisticamente favorecido em uma espécie de planta específica. Portanto, a otimização de códon da sequência de nucleotídeo nativo pode compreender a determinação de quais códons, dentro da sequência de
20 nucleotídeo nativa, 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 do códon. Uma sequência modificada de nucleotídeo pode ser
25 total ou parcialmente otimizada para a utilização de códon da planta, contanto que a proteína codificada pela sequência modificada de nucleotídeo seja produzida em um nível mais alto do que a proteína codificada pelo gene naturalmente

ocorrente ou nativo correspondente. A construção dos genes sintéticos ao alterar a utilização do códon é descrita em, por exemplo, Pedido de Patente PCT 93/07278.

Assim, a presente invenção
5 abrange as seqüências de ácido nucléico descritas acima; seus fragmentos; seqüências passíveis de cruzamento com relação a isso; seqüências homólogas à mesma, seqüências codificando polipeptídeos semelhantes com diferente utilização do códon, seqüências alteradas caracterizadas por
10 mutações, tais como exclusão, inserção ou substituição de um o mais nucleotídeos, sejam naturalmente ocorrentes ou induzidos pelo homem, sejam aleatoriamente ou de um modo dirigido.

Os polinucleotídeos acima
15 descritos também codificam os polipeptídeos previamente não caracterizados.

Dessa forma, a presente invenção fornece um polipeptídeo com uma seqüência de aminoácido conforme ainda descrito abaixo, pelo menos cerca
20 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
25 cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de

98 %, pelo menos cerca de 99 %, ou mais, digamos, 100 % homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-56, 58-63, 66-119, 139-154 ou 155.

5 A presente invenção também abrange os fragmentos dos polipeptídeos e polipeptídeos com mutações acima descritos, tais como, exclusões, inserções ou substituições de um ou mais aminoácidos, sejam naturalmente ocorrentes ou induzidos pelo homem, sejam aleatoriamente ou
10 de um modo dirigido.

 Uma planta adequada para uso com o método da presente invenção pode ser qualquer planta monocotiledônea ou dicotiledônea, incluindo, porém sem limitação a, milho, trigo, cevada, centeio, aveia, arroz,
15 soja, amendoim, ervilha, lentilha e alfafa, algodão, semente de colza, canola, pimenta, girassol, batata, tabaco, tomate, berinjela, eucalipto, uma árvore, uma planta ornamental, uma grama permanente e uma safra de forragem.

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

 Preferivelmente, a transformação é efetuada ao introduzir na célula da planta

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

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

Qualquer sequência adequada de
15 promotor pode ser utilizada pela construção de ácido nucléico da presente invenção. Preferivelmente, o promotor é um promotor constitutivo, um específico do tecido ou um promotor induzível de estresse abiótico.

Os promotores constitutivos
20 adequados incluem, por exemplo, promotor de CaMV 35S (SEQ ID N°: 120; Odell et al., Natureza 313:810-812, 1985); promotor de At6669 Arabidopsis (SEQ ID N°: 121, patente N° WO2004/104162); milho Ubi 1 (Christensen et al., Plant Sol. Biol. 18:675-689, 1992); actina de arroz (McElroy et al.,
25 Célula da planta 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., Genet. de Apl. Teor. 81:581-588, 1991); e Synthetic Super MAS (Ni et al., O Diário da Planta 7: 661-76, 1995). Outros promotores constitutivos incluem aqueles nas Patentes dos

EUA N°s 5.659.026; 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; e 5.608.142.

Os promotores específicos do tecido adequados incluem, porém não são limitados a, 5 promotores específicos de folha, tais conforme descritos, por exemplo, por Yamamoto et al., J. de Planta 12:255-265, 1997; Kwon et al., Fisiol. de Planta. 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., Fisiol. de célula da planta 35:773-778, 1994; Gotor et al., J. de Planta 3:509-18, 1993; Orozco et 10 al., Biol. Mol. da Planta 23:1129-1138, 1993; e Matsuoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9586-9590, 1993.

Os promotores induzíveis de estresse abiótico adequados incluem, porém não são limitados a, promotores induzíveis de sal, tais como RD29A (Yamaguchi- 15 Shinozalei et al., Mol. Gen. Genet. 236:331-340, 1993); promotores induzíveis de seca, tais como o promotor de gene rab17 de milho (Pla et. al., Plant Mol. Biol. 21:259-266, 1993), promotor de gene rab28 de milho (Busk et. al., J. da Planta 11:1285-1295, 1997) e promotor de gene Ivr2 de milho 20 (Pelleschi et. al., Plant Mol. Biol. 39:373-380, 1999); e promotores induzíveis de calor, tais como, o promotor de hsp80 do tomate a partir do tomate (Pat. dos EUA N° 5.187.267).

A construção de ácido nucléico 25 da presente invenção preferivelmente ainda inclui um marcador selecionável apropriado e/ou uma origem de replicação. Preferivelmente, a construção de ácido nucléico utilizada em um vetor transportador, o qual pode propagar

tanto em *E. coli* (em que a construção compreende um marcador selecionável apropriado e origem de replicação) e ser compatível com a propagação nas células. A construção de acordo com a presente invenção pode ser, por exemplo, um
5 plasmídeo, um bacmídeo, um fagemídeo, um cosmídeo, um fago, um vírus ou um cromossomo artificial.

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

Existem diversos métodos para introduzir genes estrangeiros nas plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Potrykus, I., Rev. Anual de Fisiol. de Planta, Biol. Mol. da Planta (1991) 42:205-225; Shimamoto et
20 al., Natureza (1989) 338:274-276).

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

(i) Transferência do gene mediado por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) Rev. Anual da Fisiol. de Planta 38:467-486; Klee e Rogers em Cultura de Célula e Genética Somática da Célula de Plantas, Vol. 6, Biologia Molecular dos Genes Nucleares da Planta, eds. Schell, J., e Vasil, L. K.,

Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25;
 Gatenby, em *Biotecnologia da Planta*, eds. Kung, S. e
 Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989)
 p. 93-112.

- 5 (ii) Absorção direta do DNA: Paszkowski et al., em *Cultura de Célula e Genética Somática da Célula de Plantas*, Vol. 6, *Biologia Molecular dos Genes Nucleares da Planta* eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; incluindo os métodos para absorção
- 10 direta do DNA em protoplastas, Toriyama, K. et al. (1988) *Bio/Tecnologia* 6:1072-1074. Absorção do DNA induzida por breve choque elétrico da células da planta: Zhang et al. *Rep. de célula da planta* (1988) 7:379-384. Fromm et al. *Natureza* (1986) 319:791-793. Injeção de DNA nas células da
- 15 planta ou tecidos através de bombardeio de partícula, Klein et al. *Bio/Tecnologia* (1988) 6:559-563; McCabe et al. *Bio/Tecnologia* (1988) 6:923-926; Sanford, *Fisiol. Planta* (1990) 79:206-209; através do uso de sistemas de micropipetas: Neuhaus et al., *Genet. de Apl. Teor.* (1987)
- 20 75:30-36; Neuhaus e Spangenberg, *Fisiol. Planta* (1990) 79:213-217; transformação de cristal capilar de fibras de vidro ou carboneto de silício das culturas de célula, embriões ou tecido de calo, Pat. dos EUA Nº 5.464.765 ou pela incubação direta do DNA com pólen de germinação, DeWet
- 25 et al. em *Manipulação Experimental do Tecido de Óvulo*, eds. Chapman, G. P. e Mantell, S. H. e Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; e Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:715-719.

O sistema de *Agrobacterium* inclui o uso de vetores de plasmídeo que contêm os segmentos definidos de DNA que se integram ao DNA genômico da planta. Os métodos de inoculação do tecido da planta variam dependendo das espécies de planta e o sistema de administração de *Agrobacterium*. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco da folha que pode ser realizado com qualquer explante de tecido que fornece uma boa fonte para iniciação de toda a diferenciação da planta. Horsch et al. em Manual de Biologia Molecular da Planta A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Uma abordagem complementar emprega o sistema de administração de *Agrobacterium* em combinação com a infiltração a vácuo. O sistema de *Agrobacterium* é especialmente viável na criação das plantas dicotiledôneas transgênicas.

Existem diversos métodos de transferência direta do DNA nas células da planta. Na eletroporação, as protoplastas são brevemente expostas a um forte campo elétrico. Na microinjeção, o DNA é mecanicamente injetado diretamente nas células utilizando micropipetas muito pequenas. No bombardeio de micropartícula, o DNA é adsorvido em microprojéteis, tais como cristal de sulfato de magnésio ou partículas de tungstênio, e os microprojéteis são fisicamente acelerados nas células ou tecidos de planta.

Após a transformação estável, a propagação da planta é exercida. O método mais comum de propagação da planta é por semente. A regeneração por propagação de semente, entretanto, possui a deficiência que,

devido à heterozigosidade, existe uma falta de uniformidade na safra, considerando que as sementes são produzidas pelas plantas de acordo com as variâncias genéticas regidas pelas leis de Mendelian. Basicamente, cada semente é geneticamente diferente e cada crescerá com seus próprios traços específicos. Portanto, é preferido que a planta transformada seja produzida de modo que a planta regenerada possua os traços e as características idênticos à planta transgênica precursora. Portanto, é preferido que a planta transformada seja regenerada por micropropagação que fornece uma reprodução rápida e consistente das plantas transformadas.

A micropropagação é um processo de crescimento de plantas de nova geração a partir de uma única peça de tecido que foi removida a partir de uma planta precursora selecionada ou cultivar. Esse processo permite a reprodução em massa das plantas com o tecido preferido expressando a proteína de fusão. As plantas de nova geração que são produzidas são geneticamente idênticas a, e possuem todas as características de, a planta original. A micropropagação permite a produção em massa de material de planta de qualidade em um curto período de tempo e oferece uma rápida multiplicação de cultivares selecionados na preservação das características da planta transformada ou transgênica original. As vantagens da clonagem de plantas são a velocidade da multiplicação da planta e a qualidade e uniformidade das plantas produzidas.

A micropropagação é um procedimento de etapa múltipla que exige a alteração do meio

de cultura ou condições de crescimento entre as etapas. Dessa forma, o processo de micropropagação envolve quatro etapas básicas: Etapa um, cultura inicial do tecido; etapa dois, multiplicação da cultura de tecido; Etapa três, 5 diferenciação e formação da planta; e etapa quatro, cultura em estufa e endurecimento. Durante a etapa um, cultura inicial do tecido, a cultura do tecido é estabelecida e certificada como livre de contaminantes. Durante a etapa dois, a cultura inicial do tecido é 10 multiplicada até um número suficiente de amostras de tecido ser produzido para atender os objetivos de produção. Durante a etapa três, as amostras de tecido cultivadas na etapa dois são divididas e cultivadas em plântulas individuais. Na etapa quatro, as plântulas transformadas são transferidas a 15 uma estufa para endurecimento, em que a tolerância das plantas à luz é gradualmente aumentada, de modo que possa ser cultivada no ambiente natural.

Preferivelmente, as plantas transformadas maduras geraram, conforme acima descrito, são 20 ainda selecionadas para tolerância ao estresse abiótico. De forma correspondente, as plantas transformadas e não transformadas (do tipo selvagem) são expostas a uma condição de estresse abiótico, tal como, privação de água, temperatura sub-ideal, deficiência de nutriente, ou 25 preferivelmente uma condição de estresse de sal. O estresse de sal pode ser efetuado de diversas formas, tais como, por exemplo, ao irrigar as plantas com uma solução excessivamente osmótica, ao cultivar as plantas

hidroponicamente em uma solução de crescimento excessivamente osmótica (p.ex., solução Hoagland), ou ao cultivar as plantas em um meio de crescimento excessivamente osmótico (p.ex., meio MS). Considerando que as diferentes

5 plantas variam consideravelmente em sua tolerância à salinidade, a concentração de sal na água de irrigação, solução de crescimento ou meio de crescimento é preferivelmente ajustada de acordo com as características específicas de cultivar de planta específica ou variedade,

10 de modo a infligir um efeito suave ou moderado na fisiologia e/ou morfologia das plantas (para diretrizes com relação à concentração apropriada, vide Bernstein e Kafkafi, Crescimento de Raiz Sob Estresse de Salinidade Em: Raízes de Planta, The Hidden Half 3rd ed. Waisel Y, Eshel A e Kafkafi

15 U. (editores) Marcel Dekker Inc., New York, 2002, e referência lá contida). Após a exposição à condição de estresse, as plantas são frequentemente monitoradas até os efeitos substanciais fisiológicos e/ou morfológicos aparecerem em plantas do tipo selvagem. Subseqüentemente, as

20 plantas transformadas que não exibem efeitos substanciais fisiológicos e/ou morfológicos, ou que exibem biomassa maior do que as plantas do tipo selvagem, são identificadas como plantas tolerantes ao estresse abiótico.

25 Embora a transformação estável seja atualmente preferida, a transformação transitória das células de folha, células de meristema ou toda a planta, também é contemplada pela presente invenção.

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

5 Os vírus que se mostraram úteis para a transformação de hospedeiros de planta incluem CaMV, TMV e BV. A transformação de plantas utilizando os vírus de planta é descrita na Pat. dos EUA N° 4.855.237 (BGV), EP-A 67.553 (TMV), Pedido Publicado Japonês N° 63-
10 14693 (TMV), EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); e Gluzman, Y. et al., Comunicações em Biologia Molecular: Vetores Virais, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172-189 (1988). As partículas de pseudovírus para uso na expressão do DNA estrangeiro em muitos hospedeiros, incluindo as
15 plantas, são descritas em WO 87/06261.

Preferivelmente, o vírus da presente invenção é avirulento e, assim, é incapaz de provocar sintomas graves, tais como taxa reduzida de crescimento, mosaico, manchas em anel, enrolamento da folha,
20 amarelecimento, listras, formação de erupções, formação de tumor e sulcos. Um vírus avirulento adequado pode ser um vírus avirulento naturalmente ocorrente ou um vírus artificialmente atenuado. A atenuação de vírus pode ser efetuada ao utilizar os métodos bem conhecidos na técnica,
25 incluindo, porém não limitado a, aquecimento sub-letal, tratamento químico ou por técnicas direcionadas de mutagênese, tais conforme descritas, por exemplo, por Kurihara e Watanabe (Patologia de Planta Molecular 4:259-

269, 2003), Gal-on et al. (1992), Atreya et al. (1992) e Huet et al. (1994).

As cepas adequadas de vírus podem ser obtidas a partir das fontes disponíveis, tais como, por exemplo, a American Type culture Collection (ATCC) ou por isolamento de plantas infectadas. O isolamento dos vírus a partir de tecidos infectados de planta pode ser efetuado pelas técnicas bem conhecidas na técnica, tais conforme descritas, por exemplo, por Foster e Tatlor, Eds. "Protocolos de Virologia de Planta: A Partir do Isolamento de Vírus para Resistência Transgênica (Métodos na Biologia Molecular (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998. Brevemente, os tecidos de uma planta infectada são acreditados como contendo uma alta concentração de um vírus adequado, preferivelmente folhas jovens e pétalas de flores, são trituradas em uma solução tampão (p.ex., solução tampão de fosfato) para produzir uma seiva infectada por vírus que pode ser utilizada em inoculações subseqüentes.

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

Quando o vírus é um vírus de DNA, as modificações adequadas podem ser feitas ao próprio vírus. Alternativamente, o vírus pode primeiro ser clonado

em um plasmídeo bacteriano para facilidade de construção do vetor viral desejado com o DNA estrangeiro. O vírus pode ser então removido a partir do plasmídeo. Se o vírus for um vírus de DNA, uma origem bacteriana de replicação pode ser
5 ligada ao DNA viral, que é então replicado pela bactéria. A transcrição e tradução desse DNA produzirá a proteína de revestimento que envolverá o DNA viral. Se o vírus for um vírus de RNA, o vírus é geralmente clonado como um cDNA e inserido em um plasmídeo. O plasmídeo é então utilizado para
10 realizar todas as construções. O vírus de RNA é então produzido ao transcrever a sequência viral do plasmídeo e tradução dos genes virais para produzir a(s) proteína(s) revestimento que envolve(m) o RNA viral.

A construção dos vírus de
15 planta de RNA para a introdução e expressão nas plantas de sequências de polinucleotídeo exógeno não viral, tais como aquelas incluídas na construção da presente invenção, é demonstrada pelas referências acima, bem como na Pat. dos EUA N° 5.316.931.

20 Em uma configuração, um polinucleotídeo viral de planta é fornecido, em que a sequência de codificação da proteína de revestimento nativa foi excluída a partir de um polinucleotídeo viral, uma sequência de codificação da proteína de revestimento não
25 nativa e um promotor não nativo, preferivelmente o promotor subgenômico da sequência de codificação da proteína de revestimento não nativa, capaz de expressão no hospedeiro de planta, empacotamento do polinucleotídeo viral da planta

recombinante, e garantia de uma infecção sistemática do hospedeiro pelo polinucleotídeo viral da planta recombinante, foram inseridos. Alternativamente, o gene da proteína de revestimento pode ser desativado por inserção da
5 sequência de polinucleotídeo não nativa dentro dele, de modo que uma proteína seja produzida. O polinucleotídeo viral de planta recombinante pode conter um ou mais promotores subgenômicos não nativos adicionais. Cada promotor subgenômico não nativo é capaz de transcrever ou expressar
10 os genes adjacentes ou sequências de polinucleotídeo no hospedeiro de planta e incapaz de recombinação entre si e com promotores subgenômicos nativos. As sequências de polinucleotídeo não nativo (estrangeiro) podem ser inseridas adjacentes ao promotor subgenômico viral de planta
15 nativo ou aos promotores subgenômicos virais de planta não nativos, se mais de uma sequência de polinucleotídeo for incluída. As sequências de polinucleotídeo não nativo são transcritas ou expressas na planta de hospedeiro sob o controle do promotor subgenômico
20 para produzir os produtos desejados.

Em uma segunda configuração, um polinucleotídeo viral de planta recombinante é fornecido como na primeira configuração, exceto que a sequência de codificação de proteína de revestimento nativa é
25 colocada adjacente a um dos promotores subgenômicos de proteína de revestimento não nativa, ao invés de uma sequência de codificação de proteína de revestimento não nativa.

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

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

Os vetores virais são envolvidos pelas proteínas de revestimento codificadas pelo polinucleotídeo viral de planta recombinante para produzir um vírus de planta recombinante. O polinucleotídeo viral de planta recombinante ou vírus de planta recombinante é usado para infectar as plantas apropriadas de hospedeiro. O polinucleotídeo viral de planta recombinante é capaz de replicação no hospedeiro, dispersão sistêmica no hospedeiro,

e transcrição ou expressão do(s) gene(s) estrangeiro(s) (polinucleotídeo exógeno) no hospedeiro para produzir a proteína desejada.

As técnicas para inoculação de
5 vírus nas plantas podem ser encontradas em Foster e Taylor, eds. "Protocolos de Virologia de Planta: A Partir do Isolamento de Vírus para Resistência Transgênica (Métodos na Biologia Molecular (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998; Maramorosh e Koprowski, eds. "Métodos em Virologia" 7
10 vols, Academic Press, New York 1967-1984; Hill, S.A. "Métodos na Virologia de Planta", Blackwell, Oxford, 1984; Walkey, D.G.A. "Virologia Aplicada de Planta", Wiley, New York, 1985; e Kado e Agrawa, eds. "Princípios e Técnicas na Virologia de Planta", Van Nostrand-Reinhold, New York.

15 Além do acima, o polinucleotídeo da presente invenção também pode ser introduzido em um genoma de cloroplasto, assim permitindo a expressão do cloroplasto.

Uma técnica para introduzir as
20 seqüências de polinucleotídeo exógeno ao genoma dos cloroplastos é conhecida. Essa técnica envolve os seguintes procedimentos. Primeiro, as células da planta são quimicamente tratadas, de modo a reduzir o número de cloroplastos por célula para cerca de um. Então, o
25 polinucleotídeo exógeno é introduzido através do bombardeio de partícula nas células com o objetivo de introduzir pelo menos uma molécula de polinucleotídeo exógeno nos cloroplastos. Os polinucleotídeos exógenos selecionados, de

modo que eles são passíveis de integração no genoma do cloroplasto através de recombinação homóloga, que é prontamente efetuada pelas enzimas inerentes no cloroplasto. Para essa finalidade, o polinucleotídeo exógeno inclui, além
5 de um gene de interesse, pelo menos um estiramento de polinucleotídeo que é derivado a partir do genoma de cloroplasto. Além disso, o polinucleotídeo exógeno inclui um marcador selecionável, o qual atua através de procedimentos
10 seqüências de seleção para verificar que todas ou substancialmente todas as cópias dos genomas de cloroplastos após tal seleção incluirão o polinucleotídeo exógeno. Os detalhes adicionais relacionados a essa técnica são, encontrados nas Pat. dos EUA N°s 4.945.050; e 5.693.507, as
quais são incorporadas no presente por referência. Um
15 polipeptídeo pode assim ser produzido pelo sistema de expressão da proteína do cloroplasto e tornar-se integrado à membrana interna do cloroplasto.

Considerando que a tolerância ao estresse abiótico nas plantas pode envolver múltiplos
20 genes atuando de modo aditivo ou em sinergia (vide, por exemplo, em Quesda et al., Fisiol. de Planta. 130:951-063, 2002), a presente invenção também abrange a expressão de uma pluralidade de polinucleotídeos exógenos em uma única planta de hospedeiro para assim atingir a tolerância superior ao
25 estresse abiótico.

A expressão de uma pluralidade de polinucleotídeos exógenos em uma única planta de hospedeiro pode ser efetuada pela introdução conjunta de

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

5 Alternativamente, a expressão de uma pluralidade dos polinucleotídeos exógenos em uma única planta de hospedeiro pode ser efetuada pela introdução de diferentes construções de ácido nucléico, incluindo diferentes polinucleotídeos exógenos, em uma pluralidade de
10 plantas. As plantas regeneradas transformadas podem então ser criadas de forma cruzada e a progênie resultante selecionada para tolerância superior aos traços de estresse abiótico e/ou biomassa, utilizando as técnicas convencionais de culturação de planta.

15 Conseqüentemente, o presente pedido fornece os métodos para utilizar os novos genes de tolerância ao estresse abiótico para aumentar a tolerância ao estresse abiótico e/ou biomassa em uma ampla faixa de plantas econômicas, de uma forma segura e econômica.

20 As plantas estão sujeitas a uma faixa de desafios ambientais. Diversos desses, incluindo o estresse de sal, estresse osmótico geral, estresse de seca e estresse de resfriamento, possuem a capacidade de impactar toda a disponibilidade de planta e água celular. De maneira
25 não surpreendente, então, as respostas de planta a essa coleção de estresses são relacionadas. Em uma revisão recente, Zhu observou que "a maioria dos estudos com relação à sinalização do estresse de água enfocou no estresse de sal

principalmente devido às respostas de planta ao sal e seca serem estreitamente relacionadas e os mecanismos se sobrepõe" (Zhu (2002) Rev. Anual de Biol. da Planta 53: 247-273). Muitos exemplos de respostas e vias semelhantes a esse conjunto de estresses foram documentados. Por exemplo, os fatores de transcrição de CBF foram demonstrados para a resistência de condição ao sal, resfriamento e seca (Kasuga et al. (1999) Biotecnol. da Natureza 17: 287-291). O gene de *Arabidopsis* rd29B é induzido em resposta ao estresse de sal e desidratação, um processo que é mediado amplamente através de um processo de transdução do sinal de ABA (Uno et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11632-11637), resultando em atividade alterada dos fatores de transcrição que aglutinam a um elemento a montante dentro do promotor de rd29B. Na *Mesembryanthemum crystallinum* (planta de gelo), Patharker e Cushman demonstraram que uma quinase de proteína dependente do cálcio (McCDPK1) é por exposição aos estresses de seca e sal (Patharker e Cushman (2000) J. da Planta 24: 679-691). A quinase induzida por estresse também foi demonstrada para fosforilar um fator de transcrição, presumidamente alterando sua atividade, embora os níveis de transcrição do fator de transcrição alvo não sejam alterados em resposta ao estresse de sal ou seca. De forma semelhante, Saijo et al. demonstraram que uma quinase de proteína dependente de calmodulina induzida por sal/seca (OsCDPK7) conferiu tolerância aumentada de sal e seca ao arroz quando expresso em excesso (Saijo et al. (2000) J. da Planta 23: 319-327).

A exposição à desidratação invoca estratégias semelhantes de sobrevivência nas plantas, assim como o estresse de resfriamento (vide, por exemplo, Yelenosky (1989) Fisiol. de Planta 89: 444-451) e o estresse de seca induz a tolerância ao resfriamento (vide, por exemplo, Siminovitch et al. (1982) Fisiol. de Planta 69: 250-255; e Guy et al. (1992) Planta 188: 265-270). Além da indução das proteínas aclimação ao frio, as estratégias que permitem que as plantas sobrevivam em baixas condições de água podem incluir, por exemplo, área de superfície reduzida, ou óleo de superfície ou produção de cera.

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

As sequências de polinucleotídeo da presente invenção são capazes de aumentar uma biomassa de uma planta. Será apreciado que a capacidade dos polipeptídeos da presente invenção aumente o

rendimento/biomassa/vigor da planta sendo inerente a sua capacidade de promover o aumento no tamanho de célula da planta (conforme mostrado no Exemplo 8 e Figura 2).

Assim, a presente invenção
5 também abrange um método para aumentar uma biomassa/vigor/rendimento de uma planta (plantas coníferas, musgo, alga, monocotiledônea ou dicotiledônea, bem como outras plantas listadas em <http://www.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae>).

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

Conforme aqui utilizado, a frase "vigor da planta" refere-se a quantia ou quantidade de tecido produzido a partir da planta em determinado tempo. Assim, o vigor aumentado poderia determinar ou afetar o
20 rendimento da planta ou o rendimento conforme tempo de crescimento ou área de crescimento.

Conforme aqui utilizado, a frase "rendimento da planta" refere-se a quantia ou quantidade de tecido produzido e colhido conforme a planta
25 produz o produto. Assim, o rendimento aumentado poderia afetar o benefício econômico que poderia ser obtido a partir da planta em determinada área de crescimento e/ou tempo de crescimento.

Preferivelmente, as plantas por engenharia genética da presente invenção exibem pelo menos cerca de mais 2%, mais 5 %, mais 10 %, mais 20 %, mais 30 %, mais 40 %, mais 50 %, mais 60 %, mais 70 %, mais 80 %, mais 90 % ou mesmo biomassa, vigor e/ou rendimento maior do que as plantas não transgênicas.

Os métodos de ensaio do vigor da planta, rendimento e biomassa são bem conhecidos na técnica (vide Exemplo 10).

Assim, a presente invenção é de alto valor agrícola para promover o rendimento de safras comercialmente desejadas (p.ex., biomassa do órgão vegetativo, tal como, madeira de álamo, ou órgão reprodutor, tal como, o número de sementes ou biomassa da semente).

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

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

EXEMPLOS

Referência agora é feita aos seguintes exemplos, os quais, conjuntamente com as

descrições acima, ilustram a invenção de uma forma não limitante.

De modo geral, a nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos laboratoriais utilizados na presente invenção incluem técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura. Vide, por exemplo, "Clonagem Molecular: Um Manual de laboratório" 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, New York (1998); metodologias conforme estabelecidas nas Pat. dos EUA N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Biologia da Célula: Um Compêndio 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 Básica e Clínica" (8ª Edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell e Shiigi (eds), "Métodos Seleccionados em Imunologia Celular", W. H. Freeman e Co., New York (1980); os imunoensaios disponíveis são extensivamente descritos na patente e literatura científica, vide, por exemplo, Pat. dos EUA 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);
5 "Hibridização do ácido nucléico" Hames, B. D., e Higgins S.
J., eds. (1985); "Transcrição e Tradução" Hames, B. D., e
Higgins S. J., eds. (1984); "Cultura da Célula Animal"
Freshney, R. I., ed. (1986); "Enzimas e Células
Imobilizadas" IRL Press, (1986); "Um Guia Prática para
10 Clonagem Molecular" Perbal, B., (1984) e "Métodos em
Enzimologia" Vol. 1-317, Academic Press; "Protocolos 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
15 Laboratorial" CSHL Press (1996); todos os quais são
incorporados por referência como se totalmente estabelecidos
no presente. Outras referências gerais são fornecidas em
todo este documento. Os procedimentos lá contidos são
acreditados como sendo bem conhecidos na técnica e são
20 fornecidos para conveniência do leitor.

Exceto se de outro modo
definido, todos os termos técnicos e científicos aqui
utilizados possuem os mesmos significados conforme comumente
entendidos por aquele com habilidade na técnica, aos quais
25 esta invenção pertence. Embora os métodos e materiais
semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam
ser utilizados na prática ou teste da presente invenção, os
métodos e materiais adequados são descritos abaixo.

EXEMPLO 1

Identificação dos supostos genes de tolerância ao estresse abiótico a partir de Monocotiledôneas

Os genes de tolerância ao estresse abiótico (ABST) foram identificados e validados in vivo conforme previamente descritos em WO2004/104162 para o presente cessionário. Vários genes ABS e polipeptídeos codificados através disso foram identificados a partir de dicotiledôneas (SEQ ID N°s 122-126 e 127-131, respectivamente). Foram realizados exames de seqüências ortólogas em bancos de dados genômicos de monocotiledôneas, bancos de dados NCBI [HTP://World Wide Web \(ponto\) ncbi \(ponto\) nlm \(ponto\) nih \(ponto\) gov](http://WorldWideWeb.ncbi.nlm.nih.gov) e TIGR ([HTP://World Wide Web \(ponto\) tigr \(ponto\) org/](http://WorldWideWeb.tigr.org/)) de Milho, Sorgo, Arroz e Cevada.

As etiquetas de seqüência expressa (ESTs) e seqüências de cDNA foram agrupadas e montadas utilizando o software LEADSTM (Compugen) e comparadas ao banco de dados TIGR (<http://www.tigr.org/>) das monocotiledôneas acima. De modo geral, o agrupamento de 372.000 de ESTs do milho resultou em 41.990 grupos entre eles 19.870 singletons. No Sorgo, cerca de 190.000 de ESTs foram agrupados em 39.000 grupos, enquanto na cevada 370.500 de ESTs geraram 50.000 diferentes grupos, cada um representando um diferente gene. O número semelhante de seqüências e genes agrupados foi encontrado no banco de dados genômico do arroz.

Um resumo do perfil de expressão digital foi compilado para cada grupo de acordo com todas as palavras-chave incluídas nos registros de sequência compreendendo o grupo. A expressão digital, também conhecida como northern blot eletrônico, é uma ferramenta que exibe o perfil da expressão virtual com base nas sequências de EST que formam o grupo de gene. A ferramenta pode fornecer o perfil de expressão de um grupo em termos da anatomia de planta (em quais tecidos/órgãos o gene é expresso), etapa de desenvolvimento (as etapas de desenvolvimento em que um gene pode ser encontrado) e perfil de tratamento (fornece as condições fisiológicas sob as quais um gene é expresso, tais como, seca, frio, infecção de patógeno, etc.). Considerando uma distribuição aleatória de ESTs nos diferentes grupos, a expressão digital fornece um valor de probabilidade que descreve a probabilidade de um grupo ter um total de N ESTs para conter X ESTs a partir de determinada coleção de bibliotecas. Para os cálculos de probabilidade são considerados: a) o número de ESTs no grupo, b) o número de ESTs das bibliotecas implicadas e relacionadas, c) o número geral de ESTs disponíveis que representam as espécies. Assim, os grupos com baixos valores de probabilidade são altamente enriquecidos com ESTs a partir do grupo de bibliotecas de interesse que indicam uma expressão especializada.

Os conceitos da ortologia e paralogia foram recentemente aplicados às caracterizações e classificações funcionais na escala das comparações de todo

o genoma. Os ortólogos e parólogos constituem dois tipos principais de homólogos: O primeiro desenvolveu-se a partir de um ancestral comum por especialização, e os últimos são relacionados por eventos de duplicação. É presumido que os parólogos originando-se dos eventos antigos de duplicação são prováveis de terem divergidos na função, enquanto os verdadeiros ortólogos são mais prováveis de reter função idêntica com o tempo evolucionário.

Para ainda investigar e identificar os supostos genes ortólogos de ABST a partir das espécies monocotiledôneas, dois métodos computacionais foram integrados:

(i) O método para alinhamento das seqüências ortólogas - o método é efetuado ao construir os grupos ortólogos através de taxa eucariótica múltipla, utilizando modificações no algoritmo do grupo Markov para agrupar os supostos ortólogos e parólogos. Esses supostos ortólogos foram ainda organizados de acordo com Filograma - um diagrama de ramificação (árvore) presumido como uma estimativa de uma filogenia dos genes.

(ii) O método para gerar o perfil de expressão do "Expressão digital" - Os presentes inventores realizaram trabalho considerável com o objetivo de anotar as seqüências. Os dados de expressão foram analisados e as bibliotecas de EST foram classificadas utilizando um vocabulário fixo de termos usuais, tais como, tratamentos experimentais. As anotações de todos os ESTs agrupados para um gene foram analisadas estatisticamente ao comparar sua freqüência no grupo versus

sua abundância no banco de dados, permitindo construir um perfil de expressão numérico e gráfico de tal gene, que é designado como "expressão digital".

O fundamento lógico para
5 utilizar esses dois métodos complementares é com base na
assunção de que os verdadeiros ortólogos são prováveis de
reter função idêntica no tempo evolucionário. Esses dois
métodos (padrão de sequência e expressão) fornecem dois
diferentes conjuntos de indicações sobre as semelhanças de
10 função entre os dois genes homólogos, semelhanças no nível
de sequência - aminoácidos idênticos nos domínios de
proteína e semelhanças nos perfis de expressão.

Ao comparar as sequências a
partir monocotiledôneas aos genes de ABST de tomate, os
15 níveis de homologia, entre os genes de tomate e seu melhor
gene ortólogo a partir das monocotiledôneas diferiram-se
dramaticamente, variando de 45% a 88%. Além do mais, o
perfil de expressão in silico dos genes de monocotiledôneas
não se ajusta sempre a um gene envolvido na tolerância de
20 ABS. Assim, uma pesquisa extensiva para o ortólogo funcional
das monocotiledôneas de cada gene de tomate (SEQ ID N°: 122-
131) foi efetuada.

Na tentativa de identificar os
melhores ortólogos dos genes de ABST de tomate, dois
25 conjuntos de análises foram realizados. Primeiro, as
sequências de 5 genes de ABST de tomate (SEQ ID N°: 122-126)
e suas sequências deduzidas de polipeptídeo (SEQ ID N°: 127-
131) foram comparadas a todas as supostas proteínas de

monocotiledôneas, codificadas pelas seqüências de DNA dos grupos de gene acima mencionados. A comparação foi realizada no nível de proteína, procurando a identidade maior do que 45 % ao longo de toda a seqüência de proteína.

A Tabela 1 abaixo mostra os melhores genes homólogos e seu nível de identidade para as proteínas de ABST de tomate. Depois, essas proteínas de monocotiledôneas originaram-se a partir de diferentes espécies de monocotiledôneas (cevada, sorgo e milho) foram escolhidas com base em seu padrão de expressão durante o desenvolvimento de diversas espécies de monocotiledôneas. Essa triagem foi com base na expressão digital dos genes, conforme acima descrito. A expressão digital representa a distribuição dos ESTs que compõe cada gene in silico e o desvio da distribuição efetiva a partir da distribuição aleatória. Os genes foram selecionados com base em três critérios: genes com expressão maior nas raízes, raízes e folhas e/ou induzidos por tratamentos que representam as condições de estresse do solo (seca, salinidade, deficiências do solo). Um aumento na expressão foi considerado somente nos casos em que um aumento maior do 2 vezes (relativos à distribuição aleatória de EST) era evidente com probabilidade de significância inferior a 0,05. A Tabela 2 abaixo resume o perfil de expressão dos genes em diferentes órgãos ou tecidos e os tratamentos que realçaram elevação significativa em seu nível de expressão.

Tabela 1: O nível de homologia entre os genes de ABST de tomate e seus genes homólogos a partir de monocotiledôneas.

Gene do tomate SEQ ID N°	Nome de TIGR/Conta N° do gene homólogo	Origem da planta	Nível da homologia (e valor)	% de Identidade (Porcentagem de toda a sequência de proteína)
122	TC104838 SEQ ID N° 1	Sorgo	2E-70	88%
	TC103857	Sorgo	2E-70	88%
	TC258871	Milho	1E-69	86%
	TC139195	Cevada	5E-69	86%
123	TC94284 SEQ ID N° 3	Sorgo	3E-43	45%
	TC132394	Cevada	6E-40	44%
124	TC102291 SEQ ID N° 5	Sorgo	1E-72	54%
	TC146720	Cevada	3E-99	58%
125	TC92953 SEQ ID N° 7	Sorgo	7E-59	47%
	TC91426 SEQ ID N° 9	Sorgo	4E-98	74%
	TC91474	Sorgo	5E-98	72%
	TC263205	Milho	2E-97	74%
126	TC103772 SEQ ID N° 11	Sorgo	1E-52	49%
	TC148356	Cevada	1E-54	46%
	TC260731	Milho	1E-54	46%

Tabela 2: O perfil de expressão do ABST homólogo em genes in silico conforme representado pela análise estatística de sua distribuição de ESTs

Nome do gene homólogo	Espécies de planta	Órgãos/tecidos com a expressão de gene mais alta	Aumento múltiplo (todos os resultados são significativos em valor P >0,05)	Tratamentos que induzem o nível de expressão	Aumento múltiplo (todos os resultados são significativos em valor P >0,05)
TC104838 SEQ ID N° 1	Sorgo	Etapa de pré-antese do pólen	3	Etileno, seca	2
TC103857	Sorgo	Expressão diversa	2	Nenhum*	Nenhum*
TC258871	Milho	Expressão diversa, preferencialmente na região de lignificação da célula das folhas	2	Nenhum*	Nenhum*
TC139195	Cevada	Em diversos tecidos de grão	2-3,5	Nenhum	Nenhum
TC94284 SEQ ID N° 3	Sorgo	Folhas, raízes durante o carregamento de fruta	4,5 2	Seca, deficiências de nitrogênio, acidez do solo	4 2 2
TC132394	Cevada	Folhas, coleótilo principalmente durante o desenvolvimento de fruta	2,5 3	Nenhum	Nenhum

Continuação Tabela 2					
TC102291 SEQ ID N° 5	Sorgo	Suspensão de célula e calo	3	Estresse de salinidade e seca	3
TC146720	Cevada	Sementes preferencialmente no embrião e escutelo durante maturação	2	Estresse de frio, infecção por Fusarium	3 3,5
TC92953 SEQ ID N° 7	Sorgo	Folhas durante o carregamento de fruta	2	Seca, deficiência de nitrogênio, salinidade (150Mm)	4 4 2,5
TC91426 SEQ ID N° 9	Sorgo	Raizes jovens	12	Etileno, estiolamento, acidez do solo	4 3 12
TC91474	Sorgo	Toda a muda	2	Estiolamento	16
TC263205	Milho	Sistema primário de raiz na etapa de germinação	3	Seca	2
TC103772 SEQ ID N° 11	Sorgo	Raizes jovens	2	Seca, acidez do solo	2 2
TC148356	Cevada	Calo, folhas na etapa vegetativa	4, 2	Infecção por Blumeria graminis	2
TC260731	Milho	Raiz, preferencialmente as raízes primárias	2,5	Nenhum	Nenhum

Nenhum*- Nenhum dos tratamentos com elevação significativa na expressão digital pôde ser considerado como tratamento de estresse do solo.

A combinação da triagem acima conforme descrito na Tabela 1 e na Tabela 2 acima revelou a lista final de cinco genes de monocotiledôneas que são previstos para serem os mais relacionados aos genes de ABST de tomate (SEQ ID N°s 1, 3, 5, 7, 9).

As seqüências selecionadas de polinucleotídeo (Tabela 3 abaixo) foram analisadas para presença de ORFs utilizando Vector NTI suíte (InforMax, U.K.) versão 6 (Hasting Software, Inc: www.generunner.com/). Os ORFs identificados em cada uma dessas seqüências de polinucleotídeo foram comparados com as seqüências do banco

de dados Genbank, utilizando Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/); o ORF que exibe a homologia mais alta a uma sequência ou sequências GenBank foi mapeado com a finalidade de identificar um códon de início de ATG. A

5 posição do códon de início de ATG desse ORF foi então comparada ao da sequência identificada de polinucleotídeo com a finalidade de verificar que cada uma das cinco sequências aqui descritas inclui um ORF de comprimento total e um códon de início de ATG (assim se qualifica como um

10 "suposto gene de ABST de monocotiledôneas").

Tabela 3

Genes de ABST de monocotiledôneas

ABST de tomate SEQ ID Nº	Gene ABST de Monocotiledôneas Homólogas SEQ ID Nº:	Gene de ABST* artificialmente otimizado SEQ ID Nº:
122	1	156
123	3	157
124	5	158
125	7	
125	9	
126	11	159

* - Ainda descrito no Exemplo 2 abaixo.

Os polipeptídeos com homologia

15 significativa aos genes de ABST de monocotiledôneas foram identificados a partir dos bancos de dados NCBI utilizando o software BLAST (Tabela 4).

Tabela 4

Homólogos de ABST

Suposto gene de ABST de monocotiledônea SEQ ID No.	Homólogo de Polipeptídeo de ABST, codificado por Acesso TIGR Nº/SEQ ID Nº:	Organismo Fonte	Homólogo de Polipeptídeo de ABST SEQ ID No.	Homologia na sequência de polipeptídeo (%)
1	TC270110/162	Zea mays	13	100
1	TC56855/163	Saccharum officinarum	14	100
1	TC104838/287	sorghum	15	100
1	TC57929/164	Saccharum officinarum	16	98

Continuação da Tabela				
1	TC103857/165	sorghum	17	98
1	TC262554/166	Oryza sativa	18	98
1	TC258871/167	Zea mays	19	97
1	TC139195/168	Hordeum vulgare	20	96
1	TC262556/169	Oryza sativa	21	95
1	TC232174/170	Triticum aestivum	22	95
1	TC232139/171	Triticum aestivum	23	95
1	TC139194/172	Hordeum vulgare	24	95
1	CA486561/173	Triticum aestivum	25	100
1	TC258873/174	Zea mays	26	100
1	CA187014/175	Saccharum officinarum	27	90
1	TC233455/176	Triticum aestivum	28	96
1	CF063450/177	Zea mays	29	98
1	CA617041/178	Triticum aestivum	30	100
3	TC94284/179	sorghum	31	100
3	TC49791/180	Saccharum officinarum	32	95
5	TC93449/181	Sorghum	33	100
5	TC49718/182	Saccharum officinarum	34	95
5	TC49720/183	Saccharum officinarum	35	96
7	TC92953/184	Sorghum	36	100
7	TC66617/185	Saccharum officinarum	37	90
7	TC273860/186	Zea mays	38	91
7	TC253191/187	Zea mays	39	90
11	TC103772/188	sorghum	40	100
11	TC272084/189	Zea mays	41	92
11	TC60928/190	Saccharum officinarum	42	94
1	TC5422/191	Canola	43	88
1	TC904/192	Canola	44	88
1	TC121774/193	Solanum tuberosum	45	88
1	TC40342/194	Gossypium	46	88
1	TC40115/195	Gossypium	47	88
1	TC155918/196	Lycopersicon esculentum	48	88
1	TC154398/197	Lycopersicon esculentum	49	88
1	TC154397/198	Lycopersicon esculentum	50	88
1	TC153989/199	Lycopersicon esculentum	51	88
1	TC120511/200	Solanum tuberosum	52	88
1	TC113582/201	Solanum tuberosum	53	88
1	TC112701/202	Solanum tuberosum	54	88
1	TC111912/203	Solanum tuberosum	55	88
1	TC4674/204	Capsicum annum	56	88
1	TC270923/205	arabidopsis	57	87
1	CD823817/206	Canola	58	86
1	TC526/207	Canola	59	86
1	TC525/208	Canola	60	86
1	BG442528/209	Gossypium	61	87
1	TC33702/210	Gossypium	62	87
1	TC32714/211	Gossypium	63	87
1	TC270782/212	arabidopsis	64	87
1	TC225449/213	Glycine max	65	87
1	TC5255/214	Capsicum annum	66	88
1	TC28221/215	populus	67	84
1	TC108140/216	medicago	68	85
1	TC28222/217	populus	69	84
1	TC94402/218	medicago	70	84
1	TC28223/219	populus	71	83

Continuação da Tabela 4				
1	TC102506/220	medicago	72	85
1	NP890576/223	Oryza sativa	73	76
1	TC280376/224	Oryza sativa	74	73
1	CN009841/225	Triticum aestivum	75	75
1	BI948270/226	Hordeum vulgare	76	75
1	TC259334/227	arabidopsis	77	75
1	BQ767154/228	Hordeum vulgare	78	73
1	TC60345/229	Saccharum officinarum	79	73
1	TC138474/230	Hordeum vulgare	80	85
1	TC41472/231	populus	81	72
1	BJ458177/232	Hordeum vulgare	82	72
1	CB674176/233	Oryza sativa	83	82
1	TC216405/234	Glycine max	84	88
1	AJ777371/235	populus	85	70
1	CV019213/236	tobacco	86	85
1	CK215690/237	Triticum aestivum	87	80
1	CD830784/238	canola	88	85
1	CA624722/239	Triticum aestivum	89	85
1	TC32906/240	populus	90	76
1	CR285127/241	Oryza sativa	91	89
1	TC251945/242	Triticum aestivum	92	72
3	TC274823/243	Oryza sativa	93	77
3	TC132394/244	Hordeum vulgare	94	75
3	TC267180/245	Triticum aestivum	95	77
3	TC261921/246	Zea mays	96	87
3	TC267181/247	Triticum aestivum	97	74
3	TC261922/248	Zea mays	98	81
3	TC267182/249	Triticum aestivum	99	73
5	TC249531/250	Zea mays	100	86
5	TC232170/251	Triticum aestivum	101	85
5	TC146720/252	Hordeum vulgare	102	85
5	TC249329/253	Oryza sativa	103	84
5	TC249532/254	Zea mays	104	88
5	TC232150/255	Triticum aestivum	105	85
5	TC249330/256	Oryza sativa	106	76
5	CB672603/257	Oryza sativa	107	71
5	TC32440/258	Gossypium	108	81
5	TC119105/259	Solanum tuberosum	109	72
7	TC247999/260	Triticum aestivum	110	78
7	TC247359/261	Triticum aestivum	111	77
7	TC132566/262	Hordeum vulgare	112	77
7	TC248676/263	Triticum aestivum	113	74
7	TC249667/264	Oryza sativa	114	77
7	TC66618/265	Saccharum officinarum	115	88
9	TC253495/266	Oryza sativa	116	90
11	TC267485/284	Triticum aestivum	117	77
11	TC148621/285	Hordeum vulgare	118	76
11	TC275474/286	Oryza sativa	119	85
11	TC275473/283	Oryza sativa	139	78
9	TC224823/267	Glycine max	140	75
9	TC234990/268	Triticum aestivum	141	74
9	TC266178/269	Triticum aestivum	142	73
9	TC119051/270	Solanum tuberosum	143	83
9	TC56409/271	Saccharum officinarum	144	75
9	TC35873/272	Populus	145	80

continuação da tabela 4				
9	TC119052/273	Solanum tuberosum	146	82
9	TC204518/274	Glycine max	147	85
9	TC112169/275	Solanum tuberosum	148	84
9	TC254696/276	Zea mays	149	79
9	TC254696/277	Zea mays	150	82
9	TC248906/278	Oryza sativa	151	77
9	TC154007/279	Lycopersicon esculentum	152	82
9	TC6466/280	Capsicum annuum	153	74
9	TC131227/281	Hordeum vulgare	154	74
9	TC27564/282	Gossypium	155	71

EXEMPLO 2

Geração dos supostos genes de ABST de monocotiledôneas

As seqüências de DNA dos genes de ABST monocotiledôneas foram sintetizadas por GeneArt (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (ponto) geneart (ponto) com/). O DNA sintético foi projetado em ambiente virtual, com base nas seqüências codificadas de aminoácido dos genes de ABST de monocotiledôneas (SEQ ID N°s 2, 4, 6, 12) e usando tabelas de utilização do códons calculadas a partir de conjuntos de transcrição de plantas (é possível encontrar exemplos de tais tabelas no Banco de Dados de Utilização do Códons disponível on-line em HTP://World Wide Web (ponto) kazusa (ponto) Ou (ponto) jp/códon/). As seqüências de codificação otimizadas são projetadas de uma forma que nenhuma alteração é introduzida na seqüência de aminoácido codificada ao utilizar os códons preferidos para expressão nas plantas dicotiledôneas (principalmente tomate e Arabidopsis) e plantas monocotiledôneas, tais como o milho. Pelo menos uma mutação silenciosa por 20 pares de base de nucleotídeo foi introduzida na seqüência comparada às seqüências de monocotiledôneas ortólogas para evitar o possível silenciamento ao expressar em excesso o gene em espécies de

monocotiledôneas, tais como o milho. Para as seqüências otimizadas, os seguintes locais de enzima de restrição foram adicionados- SalI, XbaI, BamHI, SmaI na extremidade 5' e SacI na extremidade 3'. As seqüências sintetizadas pelo
 5 fornecedor (GeneArt, GmbH) foram clonadas no plasmídeo de pCR-Script. As seqüências resultantes são SEQ ID N°s 156, 157, 158, 159; representando ABST original de monocotiledôneas SEQ ID N°s 1, 3, 5, 11 respectivamente, conforme descrito na Tabela 3 acima.

10 EXEMPLO 3

Clonagem de supostos genes de ABST

Os plasmídeos de PCR Script abrigando os genes sintéticos de ABST com base em monocotiledôneas foram digeridos com as endonucleases de
 15 restrição XbaI e SacI (Roche). O fragmento resultante foi purificado utilizando o Kit de Extração de Gel (Qiagen, Alemanha) e ligado utilizando a enzima de ligase T4 DNA (Roche) no vetor de expressão da planta pKG(NOSTer), (SEQ ID N° 136), removido com as mesmas enzimas. O plasmídeo pKG é
 20 com base na espinha dorsal PCR Script, com diversas alterações no local de polylinker para facilitar a clonagem dos genes de interesse a jusante a um promotor e a montante a um terminador adequado para expressão nas células da planta. Como resultado, o gene inserido, junto com o
 25 promotor e o terminador podem ser facilmente movimentados a um vetor binário.

Os supostos genes de abrigo de pKG(NOSTer) resultante das monocotiledôneas de ABST foram

introduzidos às células competentes de DH5 do E. coli por eletroporação, utilizando um eletroporador MicroPulser (Biorad), cadinhos de 0,2 cm (Biorad) e programa de eletroporação de EC-2 (Biorad). As células tratadas foram
5 cultivadas em meio líquido LB em 37 °C por 1 h, então laminadas em ágar LB complementado com ampicilina (100 mg/L) e incubadas em 37°C por 16h. As colônias que se desenvolveram no meio seletivo foram analisadas por PCR utilizando os primers da SEQ ID N° 132 e SEQ ID N° 133, que
10 foram projetados para transpor a sequência inseridos nos plasmídeos de pKG. Os produtos resultantes de PCR foram separados em géis de agarose a 1 % e as colônias "positivas de PCR" rotuladas e ainda cultivadas. O DNA a partir das colônias positivas foi isolado utilizando (Qiagen) e
15 sequenciado utilizando o sequenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc) de modo a verificar a falta de mutações na sequência final.

A sequência do promotor de At6669 (estabelecida em SEQ ID N°: 121) foi inserida em
20 todos os plasmídeos de pKG(NÖSter) que abrigam os supostos genes de ABST de monocotiledôneas utilizando as enzimas de restrição HindIII e SalI (Roche). As colônias foram analisadas por PCR utilizando os primers SEQ ID N°: 138 e SEQ ID N°: 133. Os plasmídeos positivos foram identificados,
25 isolados e sequenciados, conforme acima descrito.

EXEMPLO 4

Geração de vetores binários compreendendo supostos genes de ABST de monocotiledôneas e promotores de planta para acionar

sua expressão

Geração de vetores binários compreendendo o promotor de At6669: As quatro construções de pKG(At6669 +NOSter) abrigando os supostos genes de ABST de monocotiledôneas a jusante da sequência do promotor de At6669 (estabelecido na SEQ ID N°: 121), e a montante do terminador da Nopalina-Sintetase (NOS), foram digeridas com HindIII e EcoRI (Roche), com a finalidade de remover os cassetes de expressão que estavam ligados no plasmídeo de pGI digerido com as mesmas endonucleases de restrição. No geral, quatro construções de pGI foram geradas, cada uma compreendendo o promotor de At6669 posicionado a montante de um suposto gene de ABST de Monocotiledôneas com uma sequência estabelecida na SEQ ID N°: 1,3,5, ,11.

O plasmídeo pPI foi construído ao inserir uma sequência de sinal poli-(A) sintético, originando-se a partir do vetor de plasmídeo básico de pGL3 (Promega, Conta N° U47295; bp 4658-4811) no local de restrição HindIII do vetor binário pBI101.3 (Clontech, Conta N° U12640). Em alguns casos, o plasmídeo binário de espinha dorsal utilizado foi o pGI, o qual é semelhante ao pPI, porém o gene de GUS foi substituído pelo gene GUS-Intron (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990).

O promotor de At6669 foi isolado a partir do DNA genômico *Arabidopsis thaliana* var Col0 por amplificação de PCR utilizando os primers estabelecidos na SEQ ID N°s: 134 e 135. O produto de PCR foi purificado (Qiagen, Alemanha) e digerido com as

endonucleases de restrição HindIII e SalI (Roche). A sequência de promotor resultante foi introduzida no vetor de pPI binário aberto digerido com as mesmas enzimas, para produzir o plasmídeo de pPI+At6669.

5 EXEMPLO 5

Transformação das células de *Agrobacterium tumefaciens* com os vetores binários abrigando os supostos genes de ABST de monocotiledôneas

Cada um dos vetores binários descrito no Exemplo 4 acima foi utilizado para transformar as células de *Agrobacterium*. Duas construções binárias adicionais, com o gene relator de Luciferase substituindo o gene de ABST de Monocotiledôneas (posicionado a jusante do promotor de 35S ou promotor de At6669), foram utilizadas como controles negativos.

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 efetuada ao utilizar um eletroporador MicroPulser (Biorad), cadinhos de 0,2 cm (Biorad) e programa de eletroporação EC-2 (Biorad). As células tratadas foram cultivadas em meio líquido LB em 28 °C por 3 h, então laminadas em ágar de LB complementado com gentamicina (50 mg/L; para cepas de *Agrobacterium* GV301) ou estreptomicina (300 mg/L; para cepa de *Agrobacterium* LB4404) e canamicina (50 mg/L) em 28 °C por 48 h. As colônias de *Abrobacterium* que se desenvolveram no meio seletivo foram analisadas por PCR utilizando os primers estabelecidos na

SEQ ID N°s: 132 e 138, que foram projetados para transpor a sequência inserida no plasmídeo de pPI. Os produtos resultantes de PCR foram isolados e seqüenciados conforme descrito no Exemplo 4 acima, de modo a verificar que as
5 seqüências corretas de ABST foram adequadamente introduzidas às células de *Agrobacterium*.

EXEMPLO 6

Transformação das plantas de *Arabidopsis thaliana* com supostos genes de ABST de monocotiledôneas

10 As plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (plantas T₀) foram transformadas utilizando o procedimento de Imersão Floral descrito por Clough e Bent (10) e por Desfeux et al. (11), com pequenas modificações. Brevemente, as Plantas T₀ foram semeadas em
15 potes de 250 ml preenchidos com mistura de crescimento com base em turfa úmida. Os potes foram cobertos com papel de alumínio e uma cúpula de plástico, mantido em 4° C por 3-4 dias, então descobertos e incubados em uma câmara de crescimento em 18-24 °C sob 16/8 h de ciclos de luz/escuro.
20 As plantas T₀ estavam prontas para transformação seis dias antes da antese.

As colônias únicas de *Agrobacterium* transportando as construções binárias foram geradas conforme descrito no Exemplo 5 acima. As colônias
25 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 h sob agitação vigorosa e então centrifugadas em 4000 rpm por 5 minutos. As pelotas

compreendendo as células de *Agrobacterium* foram novamente suspensas em um meio de transformação contendo Murashige-Skoog (Duchefa) de diluído pela metade (2,15 g/L); 0,044 μ M de benzilaminopurina (Sigma); 112 μ g/L de vitaminas B5
5 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 T_0 foi efetuada pela inversão de cada planta em uma suspensão de *Agrobacterium*, de modo que o tecido da planta acima da
10 terra foi submergido por 3-5 segundos. Cada planta T_0 inoculada foi imediatamente colocada em uma bandeja de plástico, então coberta para manter a umidade e foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 18 h, para facilitar a infecção e transformação. As plantas transformadas
15 (transgênicas) foram então descobertas e transferidas a uma estufa para recuperação e maturação. As plantas T_0 transgênicas foram cultivadas na estufa por 3-5 semanas, até as siliquas ficarem marrons e secas. As sementes foram colhidas das plantas e mantidas em temperatura ambiente até
20 a semeadura.

Para gerar as plantas transgênicas T_1 e T_2 que abrigam os genes, as sementes coletadas a partir das plantas transgênicas T_0 foram esterilizadas na superfície através de imersão em etanol a
25 70 % por 1 minuto, seguido por imersão em hipoclorito de sódio a 5 % e triton a 0,05% por 5 minutos. As sementes esterilizadas na superfície foram totalmente lavadas em água destilada estéril contendo Murashige-Skoog diluído pela

metade (Duchefa); sacarose a 2%; ágar de planta a 0,8%;
canamicina a 50 mM; e carbenicilina a 200 mM (Duchefa). As
placas de cultura foram incubadas em 4 °C por 48 horas,
então transferidas a uma sala de crescimento em 25 °C por
5 uma semana adicional de incubação. As plantas vitais T₁ de
Arabidopsis foram transferidas às placas de cultura fresca
por outra semana de incubação. Após a incubação, as plantas
T₁ foram removidas das placas de cultura e plantadas em
mistura de crescimento contida em potes de 250 ml. As
10 plantas transgênicas foram permitidas para crescer em uma
estufa até a maturidade. As sementes colhidas a partir das
plantas T₁ foram cultivadas e crescidas até a maturidade
como plantas T₂ sob as mesmas condições conforme utilizadas
para cultura e crescimento das plantas T₁.

15 EXEMPLO 7

Avaliação da germinação das plantas transgênicas cultivadas
sob as condições de estresse abiótico

A tolerância à salinidade ou
estresse osmótico tem o objetivo de identificar os genes que
20 conferem melhor germinação, vigor da muda ou crescimento em
alto sal, seca ou combinação dos mesmos ou outros estresses
ambientais. As plantas diferem em sua tolerância ao sal
(NaCl) dependendo de sua etapa de desenvolvimento, portanto,
as respostas de germinação de semente, vigor da muda e
25 crescimento são avaliadas.

Um teste de tolerância típica
à salinidade é efetuado ao obter as plantas em diferentes
etapas de desenvolvimento e irrigá-las com concentrações

crescentes de NaCl (por exemplo 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM). As plantas transgênicas são comparadas às plantas de controle em sua aparência fenotípica externa, grau de definhamento e sucesso geral para atingir a maturidade e progênie de rendimento em concentrações inibitórias às plantas de controle. Os parâmetros quantitativos da tolerância medida são conforme o caso anterior, o peso seco e úmido médio e o peso das sementes de rendimento, o tamanho médio das sementes e o número de sementes produzidas por planta. Os ensaios de estresse osmótico (incluindo ensaios de NaCl e manitol) são conduzidos para determinar se um fenótipo tolerante ao estresse osmótico é específico ao NaCl ou se é um fenótipo geral relacionado ao estresse osmótico. As plantas tolerantes ao estresse osmótico são, de modo geral, mais tolerantes às condições de seca, salinidade e resfriamento e, portanto, são altamente valiosas em termos de traços agronômicos.

Métodos:

O método utilizado para testar as plantas com relação à tolerância melhorada ao estresse abiótico inclui o teste de germinação e crescimento da muda sob condições adversas, tais como alta salinidade e alta osmose.

Ensaio de germinação - Os testes de germinação comparam a porcentagem das sementes a partir das plantas transgênicas que poderia concluir o processo de germinação (protuberância da radícula a partir do revestimento da semente e abertura completa dos

cotilédones) para a porcentagem de sementes a partir das plantas de controle tratadas da mesma forma. A avaliação da germinação e vigor da muda é conduzida por três semanas após a plantação. Para medir a germinação e crescimento da muda, 5 sementes das plantas T2 são esterilizadas na superfície e individualmente semeadas nas placas quadradas de ágar contendo, por exemplo, meio basal solidificado complementado com alta salinidade (por exemplo, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM) ou alta osmose (por exemplo, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM de manitol). O meio basal é o meio de Murashige-Skoog a 10 50 % (MS) + vitaminas complementadas com ágar de planta a 0,8 % na qualidade de agente de solidificação. Após a semeadura, as placas são transferidas por 2-3 dias em 4 °C para estratificação e então cultivadas por três semanas.

15 Para seguir a germinação e crescimento em condições adversas, as placas são selecionadas manual ou automaticamente e o tamanho de planta é determinado. Cinco a dez eventos independentes de transformação podem ser analisados a partir de cada 20 construção. As plantas que expressam os genes desta invenção são comparadas às plantas de controle semeadas nas mesmas placas sob as mesmas condições ou para a medição média de todas as construções, sementes e eventos semeados.

25 EXEMPLO 8

Avaliação do crescimento da planta transgênica sob condições de estresse abiótico

Métodos:

Resistência e análise ao estresse - Um experimento complementar realizado com mudas segue a tolerância da plantas às condições adversas. As sementes esterilizadas na superfície são semeadas no meio basal [meio de Murashige-Skoog a 50 % (MS) + vitaminas complementadas com ágar de planta a 0,8% na qualidade de agente de solidificação] na presença da canamicina (para as plantas transgênicas) ou em sua ausência (para as plantas de controle do tipo selvagem). Após a semeadura, as placas foram transferidas por 2-3 dias em 4 °C para estratificação e então cultivadas em 25 °C sob ciclos diários de luz de 23 horas e escuro de 1 hora por 7 a 10 dias. Nesse ponto de tempo, as mudas aleatoriamente escolhidas foram cuidadosamente transferidas às placas contendo as condições de alta salinidade (NaCl a 150 mM) ou condições que são semelhantes à alta osmolaridade encontrada durante a seca (manitol a 210 mM). O crescimento da planta foi seguido como uma função de tempo utilizando a formação de imagem digital. Para seguir o crescimento da planta em condições adversas, as plantas foram fotografadas no dia em que foram transferidas às condições de estresse (Dia 0). As fotos foram subsequenteiramente tiradas a cada poucos dias após transferir as plantas à condição de estresse e até 12 dias após a transferência. O tamanho da planta foi determinado a partir das fotos digitais tiradas. O software ImageJ foi utilizado para quantificar o tamanho da planta a partir das fotos digitais (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os scripts proprietários foram projetados para analisar o tamanho das plantas individuais como uma função do tempo. A Figura 1

mostra a metodologia utilizada para a quantificação da área de imagem. Cinco a dez eventos independentes de transformação foram analisados a partir de cada construção e pelo menos 6 plantas aleatoriamente selecionadas a partir de cada evento foram analisadas em cada experimento de estresse. As plantas que expressam os genes a partir desta invenção foram comparadas às plantas de controle semeadas nas mesmas placas de indução do estresse (controles internos) ou à medição média de todas as plantas de controle usadas no mesmo experimento (todos os controles).

Análise estatística - Para identificar os genes que conferem tolerância às plantas demonstrando diferenças significativas, os dados de área de planta foram analisados utilizando o programa de estatísticas JMP (Versão 5.2.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Um ANOVA unidirecional (ANalysis Of VAriance [Análise de Variância]) foi utilizado com a finalidade de detectar a variação entre os diferentes genes (populações de eventos independentes) e plantas de controle e identificar as construções e ventos demonstrando desempenho destacados estatisticamente diferentes. Para o gene versus análise de controle, um teste t de Students foi empregado, utilizando a significância de $p < 0,05$. Com a finalidade de encontrar eventos de transformação diferentes significativamente diferentes com área de planta aumentada, o teste Tukey's HSD (Honestly Significantly Different [Diferente de Forma Honesta e Significativa]) foi empregado utilizando a significância de $p < 0,05$. O ANOVA bidirecional foi usado para

identificar os eventos que demonstraram diferenças significativas na área de planta em determinados pontos do dia, comparado à área média das plantas de controle crescendo nas mesmas placas ou em todas as placas do mesmo
5 experimento. O teste t de Student foi utilizado para comparar os eventos independentes de transformação para as plantas de controle.

Resultados:

Com a finalidade de
10 identificar os genes que fornecem tolerância à salinidade ou osmose, as plantas T2 foram geradas a partir de 5 a 10 eventos transgênicos independentes a partir de cada construção. As sementes foram coletadas a partir das plantas T2 e as plantas produzidas a partir dela foram analisadas.
15 Conforme acima detalhado, as plantas foram semeadas em um meio seletivo em que as plantas transgênicas são capazes de empenho (canamicina) e após 7-10 dias (4-6 etapas de folha) as plantas foram transferidas a um meio de produção do estresse: alta salinidade (150 mM) ou alta osmose (manitol a
20 210 mM). O tamanho de planta foi analisado desde o dia da transferência e até 12 dias após isso. O teste t de Student e teste Tukey HSD foram utilizados para identificar os eventos que demonstram desempenho destacado comparado às plantas do tipo selvagem.

25 Os resultados das plantas transgênicas que expressam a SEQ ID N°s 156, 157, 158, 159, representam o ABST de monocotiledôneas originais SEQ ID N°s 1, 3, 5, 11 respectivamente, conforme descrito na Tabela 4.

acima sob o promotor de At6669 (Seq ID 121) são demonstrados. As diferenças significativas foram encontradas na capacidade das plantas transgênicas de crescer na presença do estresse de alta salinidade estresse e/ou
5 estresse de alta osmose. A Tabela 5 abaixo resume os achados dos eventos destacados que conferem a tolerância ao estresse osmótico em comparação com as plantas de controle. As diversas construções incluídas neste pedido fornecem às plantas transgênicas uma capacidade melhorada de resistir
10 aos estresses abióticos.

Conforme demonstrado, 4 de 5 eventos de transformação que expressam a SEQ ID 156 demonstram tolerância significativamente melhorada à osmose, conforme julgada pela capacidade das plantas transgênicas de
15 continuar a desenvolver da mesma forma em alta concentração de osmose (vide Tabela 5, linhas 1-5). Os resultados obtidos para a SEQ ID 156 também são demonstrados na Figura 2. No painel A são demonstradas as imagens processadas tiradas no dia 0, 5 e 12 a partir da placa que continha as plantas
20 transgênicas e plantas de controle. O painel B demonstra a área média de planta dos diferentes eventos nos diferentes pontos de tempo. Os eventos 1, 2, 3 e 4 são significativamente mais tolerantes à osmose ($p < 0,05$). Outras construções desse pedido também protegem as plantas dos
25 efeitos de alta osmose. Novamente, quatro de cinco eventos independentes de transformação que expressam a SEQ ID 159 demonstraram capacidade aumentada significativa para crescer sob condições de alta osmose (Tabela 5 abaixo, linhas 6-10).

Além disso, um dos eventos que expressam a SEQ ID 158 demonstrou tolerância significativamente alta à alta osmose do que suas plantas de controle correspondente.

Tabela 5

5 Meio de LS das plantas transgênicas T₂ de Arabidopsis cultivadas na presença de 210 mM de manitol

Número da linha	Transgene (SEQ ID N°)	Nº do Evento	Número de plantas testadas	Média menor de quadrado de áreas medidas (cm ²)	Erro Padrão
1	156	Evento 1	n=6	0,1635	0,0091
2	156	Evento 2	n=6	0,1566	0,0091
3	156	Evento 3	n=6	0,1547	0,0091
4	156	Evento 4	n=6	0,1480	0,0091
5	CONTROLE de eventos 1-4 SEQ ID 156 e eventos 1, SEQ ID 158	--	n=6	0,1150	0,0091
6	159	Evento 1	n=6	0,1141	0,0050
7	159	Evento 2	n=6	0,1104	0,0050
8	159	Evento 3	n=6	0,1020	0,0050
9	159	Evento 4	n=6	0,0824	0,0050
10	CONTROLE de Evento 1-4 SEQ ID 159	--	n=6	0,0681	0,0050
11	158	Evento 1	n=6	0,1703	0,0090

Os resultados dos testes de tolerância à salinidade estão resumidos na Tabela 6 abaixo. Conforme detalhado na Tabela 6 (linhas 1-4), três eventos transgênicos independentes com uma construção contendo a SEQ ID 156 exibiram uma tolerância significativamente mais alta ao estresse de salinidade do que as plantas de controle no experimento ($p < 0,05$). Os resultados semelhantes foram obtidos com as plantas que expressam a SEQ ID 159. Da mesma forma nesse caso, três diferentes eventos transgênicos demonstraram tolerância aumentada significativa ao estresse de salinidade comparado a suas plantas de controle comparáveis (vide Tabela 6, linhas 5-9).

Tabela 6

Meio de LS de plantas transgênicas T₂ Arabidopsis cultivadas na presença de 150 mM de NaCl

Número da linha	Transgene (SEQ ID Nº)	Promotor	Número de plantas testadas	Média menor de quadrado de áreas medidas (cm ²)	Erro Padrão
1	156	Evento 1	n=6	0,3146	0,0112
2	156	Evento 2	n=6	0,2459	0,0112
3	156	Evento 3	n=6	0,2445	0,0112
4	CONTROLE de todos os eventos SEQ ID 156	--	n=48	0,2165	0,003722
5	159	Evento 1	n=6	0,2541	0,0110
6	CONTROLE do Evento 1 SEQ ID 159	--	n=6	0,2154	0,0110
7	159	Evento 2	n=6	0, 2278	0, 0122
8	159	Evento 3	n=6	0, 2261	0, 0122
9	CONTROLE do Evento 2 e Evento 3 SEQ ID 159	--	n=6	0, 1906	0, 0122

Os experimentos independentes que avaliam a capacidade das construções de fornecer a tolerância à salinidade e alta osmose foram realizados como parte desse estudo. Foi averiguado que os genes protegem as plantas transgênicas contra os efeitos deletérios de ambos os estresses. Considerados em conjunto, os resultados claramente demonstraram a capacidade dos genes e construções incluídos neste pedido para fornecer tolerância ao estresse abiótico.

EXEMPLO 9

Avaliar as alterações na arquitetura de raiz devido à expressão dos genes de ABST de monocotiledôneas

Muitos traços chave na agricultura moderna podem ser explicados na arquitetura da

raiz. O tamanho e profundidade da raiz correlacionam-se à tolerância à seca e eficiência do uso de fertilizante. Os sistemas de raiz mais profunda podem acessar a água armazenadas em camadas mais profundas do solo. De forma semelhante, um sistema de raiz altamente ramificada fornece melhor cobertura do solo e, portanto, pode efetivamente absorver todos os macro e micronutrientes disponíveis, resultando em eficiência melhorada do uso de fertilizante. Para testar se as plantas transgênicas produzem uma diferente estrutura de raiz, as plantas são cultivadas em placas de ágar colocadas verticalmente. As placas são fotografadas a cada poucos dias e o tamanho, comprimento e área cobertos pelas raízes de planta são avaliados. A partir de cada construção criada, diversos eventos independentes de transformação são verificados. Para avaliar as diferenças significativas entre as características de raiz, é possível aplicar o ANOVA unidirecional e bidirecional utilizando o teste t de Students ou teste de Tukey HSD para identificar os eventos que demonstram as características destacadas de raiz e para fornecer um escore estatístico para os achados (vide Exemplo 8 acima).

EXEMPLO 10

Biomassa Aumentada das plantas transgênicas da presente invenção

As plantas transgênicas T_1 ou T_2 geradas conforme acima descrito são individualmente transplantadas em potes contendo uma mistura de crescimento de turfa e vermiculita (proporção de volume 3:2,

respectivamente). Os potes são cobertos pelo período de 24 h para endurecimento, então colocados na estufa em ordem aleatória completa e irrigados com água potável (fornecida na parte inferior dos potes a cada 3-5 dias) por sete dias.

5 Após isso, metade das plantas é irrigada com uma solução de sal (100 mM de NaCl e 5 mM de CaCl_2) para induzir o estresse de salinidade (condições de estresse). A outra metade das plantas continua a ser irrigada com água potável (condições normais). Todas as plantas são cultivadas na estufa em 100 %

10 de RH por 28 dias, então colhidas (o tecido acima da terra) e pesadas (imediatamente ou após a secagem no forno em 50°C por 24 h).

É apreciado que determinadas características da invenção, que são, para clareza,

15 descritas no contexto de configurações separadas, também podem ser fornecidas em combinação em uma única configuração. De forma oposta, diversas características da invenção, que são, para brevidade, descritas no contexto de uma única configuração, também podem ser

20 fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação adequada.

Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com suas configurações específicas, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações

25 serão aparentes para aqueles com habilidade na técnica. De forma correspondente, têm-se a intenção de abranger todas as tais alternativas, modificações e variações que fiquem dentro do espírito e amplo escopo das reivindicações anexas.

Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e seqüências identificados por seus números de acesso mencionados nesta especificação são aqui incorporados em sua totalidade por referência na específica, na mesma
 5 medida como se cada publicação, patente, pedido de patente ou seqüência individual identificado por seu número de acesso tenha sido específica e individualmente indicado para ser incorporado no presente por referência. Além disso, a citação ou
 10 identificação de qualquer referência neste pedido não será interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível como técnica anterior da presente invenção.

REFERÊNCIAS MENCIONADAS

- 15 (Referências adicionais são abaixo mencionadas)
1. www.fao.org/ag/agl/agll/spush/degrad.htm.
 2. www.fao.org/ag/agl/aglw/watermanagement/introduc.stm
 3. McCue KF, Hanson AD (1990). Tolerância à seca e sal: direcionado ao entendimento e aplicação. Biotecnol. de
 20 Tendências 8: 358-362.
 4. Flowers TJ, Yeo Ar (1995). Cultivação para resistência à salinidade nas plantas de safra: para onde agora? Aust J Fisiol. de Planta 22:875-884.
 5. Nguyen BD, Brar DS, Bui BC, Nguyen TV, Pham LN, Nguyen HT
 25 (2003). Identificação e mapeamento de QTL para tolerância ao alumínio introgressed [sic] a partir de nova fonte, ORYZA RUFIPOGON Griff., no arroz indica (Oryza sativa L.).
 6. Theor Appl Genet. 106:583-93.

7. Sanchez AC, Subudhi PK, Rosenow DT, Nguyen HT (2002). Mapeamento de QTLs associado com resistência à seca no sorgo (*Sorgo bicolor* L. Moench). *Plant Mol Biol.* 48:713-26.
8. Quesada V, Garcia-Martinez S, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL (2002). Arquitetura genética da tolerância ao NaCl em *Arabidopsis*. *Fisiol. de Planta.* 130:951-963.
9. Apse MP, Blumwald E (2002). Engenharia de tolerância ao sal nas plantas. *Curr Opin Biotechnol.* 13:146-150.
10. Rontein D, Basset G, Hanson AD (2002). Engenharia metabólica do acúmulo osmoprotetor nas plantas. *Eng Metab* 4:49-56
11. Clough SJ, Bent AF (1998). Imersão Floral: um método simplificado para transformação mediada por *Agrobacterium* da *Arabidopsis thaliana*. *J de Planta* 16:735-43.
- 15 12. Desfeux C, Clough SJ, Bent AF (2000). Tecidos reprodutores femininos são o alvo principal da transformação mediada por *Agrobacterium* através do método de imersão floral de *Arabidopsis*. *Fisiol. de Planta* 123:895-904.

REIVINDICAÇÕES

1. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", caracterizado por compreender a expressão dentro da planta
5 de um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-154 ou 155, assim aumentando a tolerância da planta ao estresse abiótico.
- 10 2. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o referido estresse abiótico é selecionado a partir do grupo consistindo em salinidade, privação de água, baixa
15 temperatura, alta temperatura, toxicidade de metal pesado, anaerobiose, deficiência de nutriente, excesso de nutriente, poluição atmosférica e irradiação UV.
3. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", segundo o
20 reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma planta dicotiledônea.
4. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", segundo o
reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que a referida
25 planta é uma planta monodicotiledônea.
5. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o referido

polinucleotídeo é selecionado a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 122-126, 156-285.

6. "MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA",
5 caracterizado por compreender a expressão dentro da planta de um polinucleotídeo exógeno codificando um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-154 ou 155, assim aumentando a biomassa, vigor e/ou rendimento da
10 planta.

7. "MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA", segundo o reivindicado em 6, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma planta dicotiledônea.

15 8. "MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA", segundo o reivindicado reivindicado em 6, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma planta monodicotiledônea.

20 9. "MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA", segundo o reivindicado em 6, caracterizado pelo fato de que o referido polinucleotídeo é selecionado a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 122-126, 156-285.

25 10. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO", caracterizada por compreender uma sequência de ácido nucléico pelo menos 90 % idêntica a uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 122-126, 156-285 e um promotor

capaz de instruir a transcrição da referida sequência de ácido nucléico em uma célula hospedeira.

11. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO", segundo o reivindicado em 10, caracterizada pelo
5 fato de que o referido promotor é um promotor constitutivo.

12. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO", segundo o reivindicado em 10, caracterizada pelo fato de que o referido promotor é um promotor induzível.

13. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO", segundo o reivindicado em 10, caracterizada pelo
10 fato de que a referida célula hospedeira é uma célula de planta.

14. "CÉLULA DE PLANTA", caracterizada por compreender um polipeptídeo exógeno com
15 uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % homóloga à SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-154 ou 155.

15. "CÉLULA DE PLANTA", segundo o reivindicado em 14, caracterizada pelo fato de que a referida célula de planta forma uma parte de uma
20 planta.

16. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", segundo o reivindicado em 1, caracterizado por ainda compreender o crescimento da planta expressando o referido polinucleotídeo
25 exógeno sob o estresse abiótico.

17. "MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o referido

polipeptídeo é selecionado a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-155.

18. "MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA", segundo o
5 reivindicado em 6, caracterizado pelo fato de que o referido polipeptídeo é selecionado a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-155.

19. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO", segundo o reivindicado em 10, caracterizada pelo
10 fato de que a referida sequência de ácido nucléico é selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 122-126, 156-285.

20. "POLIPEPTÍDEO ISOLADO", caracterizado por compreender uma sequência de aminoácido
15 pelo menos 90 % homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-155.

21. "POLIPEPTÍDEO ISOLADO", segundo o reivindicado em 20, caracterizado pelo fato de que
20 a referida sequência de aminoácido é selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-155.

22. "CÉLULA DE PLANTA", segundo o reivindicado em 14, caracterizada pelo fato de que
25 a referida sequência de aminoácido é selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13-119, 127-131, 139-155.

23. "CÉLULA DE PLANTA",

caracterizado por compreender um polinucleotídeo exógeno, compreendendo uma sequência de ácido nucléico pelo menos 90 % homóloga à sequência de ácido nucléico, selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 122-126, 156-285.

24. "CÉLULA DE PLANTA", segundo o reivindicado em 23, caracterizada pelo fato de que a referida sequência de ácido nucléico é selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 122-126, 156-285.

RESUMO

"MÉTODO PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA DE UMA PLANTA A UM ESTRESSE ABIÓTICO, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOMASSA, VIGOR E/OU RENDIMENTO DE UMA PLANTA, 5 CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO, CÉLULA DE PLANTA E POLIPEPTÍDEO ISOLADO", são fornecidas as seqüências de polinucleotídeo e métodos para utilizar as mesmas de modo a aumentar a tolerância de uma planta aos estresses abióticos e/ou aumentar a biomassa, vigor e/ou rendimento de uma 10 planta.