



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

(11) BR 112016015327-8 B1



(22) Data do Depósito: 29/12/2014

(45) Data de Concessão: 09/08/2022

(54) Título: MÉTODO PARA MELHORAR O CRESCIMENTO DE VOLUME DE CAULE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM ÁRVORES

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; A01H 1/00; A01H 5/00; A01H 7/00; C12N 9/10.

(30) Prioridade Unionista: 30/12/2013 FI 20136335.

(73) Titular(es): STORA ENSO OYJ.

(72) Inventor(es): JUHA IMMANEN; YRJÖ HELARIUTTA; KAISA NIEMINEN.

(86) Pedido PCT: PCT FI2014051057 de 29/12/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/101709 de 09/07/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/06/2016

(57) Resumo: MÉTODO PARA MELHORAR O CRESCIMENTO DE VOLUME DE CAULE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM ÁRVORES. A presente invenção refere-se a uma construção genética compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificadora da enzima isopentenil-transferase (IPT) biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a um promotor, que permite a expressão da dita sequência de ácido nucleico em células cambiais. A invenção se refere ainda a um método para produção de uma planta transgênica, capaz de aumentar a produção de biomassa e/ou aumentar o volume de crescimento do caule em árvores, assim como, a uma árvore que sobre-expressa uma sequência de ácido nucleico endógena ou exógena codificadora da IPT em células cambiais, e a um produto de madeira que pode ser obtido a partir da dita árvore transgênica.

“MÉTODO PARA MELHORAR O CRESCIMENTO DE VOLUME DE CAULE E
PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM ÁRVORES”.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção está correlacionada a um método para produção de uma planta transgênica, capaz de aumentar o crescimento de volume de caule e/ou a produção de biomassa, e também a um método para melhorar o crescimento de volume de caule e/ou a produção de biomassa em árvores. A invenção refere-se ainda a uma árvore geneticamente modificada, a um produto de madeira derivado da dita árvore, a construções genéticas e vetores e a uma árvore que expressa as ditas construções genéticas e vetores.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A atividade do câmbio vascular, o meristema lateral de espécies de plantas lenhosas, proporciona o surgimento de tecidos vasculares secundários. O meristema cambial forma um fino cilindro ao longo de um tronco de árvore (ou de uma raiz ou ramo), produzindo novos tecidos vasculares para dentro e para fora. Esses tecidos, xilema e floema secundários, constituem o grosso do crescimento lateral nos órgãos das plantas. As células condutoras vasculares em ambos os tecidos adquirem sua forma funcional final de maneira gradual, através de um processo de diferenciação de múltiplas etapas. O desenvolvimento das células de xilema irá se submeter à expansão, formação de parede de célula secundária, morte programada de célula e lignificação final. De modo similar, as células funcionais do floema serão formadas através de uma sucessão de diversas etapas de desenvolvimento, incluindo a diferenciação de elementos de separação e células de companhia. Esses programas de diferenciação de múltiplas etapas formam dois gradientes de desenvolvimento

opostamente orientados ao longo da região cambial; a posterior separação de uma célula de floema ou xilema é da metade meristemática, que é a mais avançada no seu processo de diferenciação. De modo bastante acentuado, o núcleo do meristema cambial, isto é, as células divisoras ativas, retêm sua natureza meristemática e permanecem não diferenciadas dentro da forma dos tecidos vasculares. As divisões das células periclinais renovam a população das células meristemáticas e proporcionam um material nascente para os programas de diferenciação dos tecidos vasculares, enquanto as divisões anticlinais possibilitam a criação de novos arquivos celulares e expansão do círculo cambial.

[0003] A escala do desenvolvimento secundário é acentuadamente diferente nas espécies de árvores; essas espécies de árvores mostram uma capacidade extrema, econômica e altamente valiosa para a produção de madeira durante sua longa duração de vida. De modo potencial, como uma adaptação para o crescimento de massa secundário, a madeira da maioria das árvores também contém um extenso sistema de transporte lateral, a rede de corrente vascular. Outros novos desafios para a função cambial das espécies arbóreas perenes são apresentados pelo ciclo anual de atividade-dormência. Para garantir a sua sobrevivência, as árvores devem adaptar sua atividade cambial ao ciclo anual de estações frias e quentes (ou estações de chuvas ou secas). Elas devem ser capazes de ativar seu meristema cambial na estação da primavera e desativar o mesmo em uma fase de repouso adormecido, durante a estação do outono.

[0004] Assim, pode ser altamente valioso para a economia da produção de madeira se o crescimento das árvores pudesse ser melhorado e se, em particular, o volume de caule pudesse ser aumentado.

[0005] A sinalização da citocinina foi demonstrada como exigida para a função cambial. As árvores transgênicas *Populus* com deficiente sinalização de citocinina exibiram um crescimento radial comprometido, provocado por uma diminuição do número de divisões celulares no câmbio vascular (Nieminen et al., 2008). Além disso, os genes codificadores dos receptores da citocinina e os genes de resposta primária da citocinina foram abundantes na região cambial do caule de *Populus* (Nieminen et al., 2008).

[0006] Conquanto que seja conhecido que a sinalização da citocinina está correlacionada à produção de biomassa das árvores, tal alusão é complicada, uma vez que existem pelo menos cerca de 100 câmbios enriquecidos e genes regulados de citocinina com diversas funções. Desse modo, não se conhece quais desses genes são necessários para o crescimento radial das células de caule (Tuskan et al., 2006).

[0007] Para juntar uma adicional complexidade à regulação hormonal do câmbio, estudos em outros tecidos revelaram uma rede altamente interligada entre a sinalização da citocinina e auxina (El-Showk et al., 2013). A citocinina pode afetar a biossíntese e o transporte da auxina. Curiosamente, essa regulação parece ser altamente complexa, na medida em que foram feitos diversos relatórios com relação aos efeitos positivo e negativo da biossíntese da citocinina e auxina. Resultados similares foram obtidos com relação ao efeito do transporte da citocinina e auxina, em que esse hormônio foi relatado para ambos os níveis transportadores supra- e infrarregulados da auxina. Mais provavelmente, esses diversos resultados refletem os padrões de regulação de fino ajuste; a citocinina pode apresentar um diferente efeito em diferentes enzimas e

transportadores biossintéticos de auxina, mais provavelmente, em um modo de tecido específico. Além disso, a auxina é também conhecida como tendo um papel similarmente complexo na regulação da biossíntese e sinalização da citocinina.

[0008] A Publicação da Patente Internacional WO 2006/034286 descreve composições e métodos que utilizam polipeptídios e polinucleotídeos de isopentenil-transferase (IPT), que estão envolvidos na modulação do desenvolvimento da planta. Nos métodos descritos, a expressão da IPT mantém ou melhora, por exemplo, a tolerância ao esforço da planta, mantém ou aumenta o tamanho da planta, mantém o conjunto de sementes ou aumenta o crescimento dos brotos.

[0009] Conquanto que algumas tentativas tenham sido feitas conforme a descrição do estado da técnica para melhorar o crescimento das plantas, existe ainda uma necessidade para métodos e construções genéticas que possam ser usadas para aperfeiçoar o crescimento de árvores, especificamente, para melhorar o crescimento de volume de caule e da produção de biomassa.

RESUMO DA INVENÇÃO

[0010] Um objetivo da presente invenção é de proporcionar uma solução para os problemas encontrados no estado da técnica. Especificamente, a presente invenção tem como objetivo proporcionar uma solução em como melhorar o crescimento de árvores. Além disso, a presente invenção tem por objetivo aumentar o crescimento de volume de caule e a produção de biomassa nas árvores.

[0011] Em particular, constitui um objetivo da presente invenção, proporcionar uma solução que melhore o crescimento radial nas árvores.

[0012] Para alcançar esses objetivos, a invenção é caracterizada pelas características que estão

relacionadas nas reivindicações independentes. As outras reivindicações representam as modalidades preferidas da invenção.

[0013] A invenção é baseada na descoberta de que é possível se intensificar a divisão celular nas células cambiais mediante o aumento da sinalização da citocina nas células cambiais. Mais especificamente, é possível de intensificar a divisão celular nas células cambiais permitindo a expressão de genes específicos que codificam a enzima isopentenil-transferase biossintética da citocinina nas células cambiais.

[0014] Foi agora surpreendentemente descoberto que mediante uma expressão intensificada da enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina nas células cambiais resulta em um intensificado aumento de volume de caule e/ou um aumento da produção de biomassa.

[0015] Conseqüentemente, em um aspecto, a presente invenção proporciona uma construção genética que compreende uma primeira seqüência de ácido nucleico (efetor) codificadora da enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a uma segunda seqüência de ácido nucleico (promotor), permitindo a expressão da dita primeira seqüência de ácido nucleico nas células cambiais, conforme definido na reivindicação 1.

[0016] A presente invenção proporciona em outro aspecto um vetor, o qual compreende a construção genética conforme definida na reivindicação 7.

[0017] Além disso, em um terceiro aspecto, a presente invenção proporciona uma árvore que superexpressa uma seqüência de ácido nucleico endógena, ou expressa uma seqüência de ácido nucleico exógena, codificadora da enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina em células cambiais, conforme definido na reivindicação 8.

[0018] Em um quarto aspecto, a presente invenção proporciona um produto de madeira que pode ser obtido a partir da árvore definida na reivindicação 16.

[0019] Em um quinto aspecto, a presente invenção proporciona um método para produção de uma planta transgênica, capaz de aumentar a produção de biomassa e/ou de aumentar o crescimento de volume de caule, quando se compara a uma planta do tipo selvagem, conforme definido na reivindicação 17.

[0020] Em um sexto aspecto, a presente invenção proporciona um método para melhorar a produção de biomassa e/ou aumentar o volume de crescimento de caule em árvores, conforme definido na reivindicação 18.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0021] A figura 1 mostra uma árvore filogenética indicando a distância média de diversas IPTs, em que a AtIPT5 é o ortólogo da *Arabidopsis* mais próximo para a AtIPT7.

[0022] A figura 2 mostra os domínios conservados dentro das IPTs; os domínios A, B e C de diferentes origens e os correspondentes domínios A', B' e C' na *Arabidopsis thaliana*. A letra X significa qualquer aminoácido, a letra X entre parênteses (X) significa um aminoácido não necessário. Os colchetes indicam qualquer um dos resíduos de aminoácidos entre os colchetes [].

[0023] A figura 3 mostra a comparação das sequências de aminoácidos de ortólogos de AtIPT7 e AtIPT5, e a sequência de consenso com mais de 50% de identidade similar (as letras maiúsculas indicam os aminoácidos com 100% de aminoácidos idênticos, enquanto as letras minúsculas indicam os aminoácidos idênticos em 50-90% das sequências comparadas).

[0024] A figura 4 mostra parte do vetor de transformação inserida no genoma da planta (ca. 8200bp). O mapa da construção mostra os diferentes locais, juntamente com sua origem, tamanho e função estimada.

[0025] A figura 5A mostra fenótipos de WT e linhas 1 e 3 de pLMX5-IPT7, de árvores *Populus*, na idade de três meses.

[0026] A figura 5B mostra o volume de tronco das linhas 1 e 3 de *Populus* transgênica, pLMX5-IPT7, quando comparado à WT.

[0027] A figura 5C mostra o ensaio de capacidade de resposta da citocinina com relação à WT e linhas de pLMX5-IPT7.

[0028] A figura 5D mostra a expressão de um receptor de citocinina (*PttHK3a*), um gene de resposta primária de sinalização de citocinina (tipo-A RR *PttRR7*), e um gene marcador de sinalização de auxina (*PttIAA3*) na WT e linha 1 pLMX5-IPT7 do caule.

[0029] A figura 6 mostra a anatomia cambial, o teor hormonal e os perfis de sinalização hormonal da WT (A) e linha de *Populus* transgênica pLMX5::IPT7, linha 1 do caule (B). Quatro frações (A-D) foram coletadas para a análise hormonal (A, B).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0030] A presente invenção proporciona árvores transgênicas tendo um aumentado crescimento de volume de caule e/ou produção de biomassa. As construções genéticas e vetores são descritos como de utilidade na produção das ditas árvores transgênicas, assim como, os métodos usados para a produção dessas árvores.

[0031] A presente invenção proporciona uma construção genética compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico (efetor) codificadora da enzima isopentenil-

transferase biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico (promotor), que permite a expressão da dita primeira sequência de ácido nucleico em células cambiais.

[0032] A expressão "uma primeira sequência de ácido nucleico" tem aqui o significado de um gene efetor, o qual codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina. A primeira sequência de ácido nucleico é selecionada do grupo que consiste de:

- a) uma sequência de ácido nucleico que compreende a SEQ ID NO:1;
- b) uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO:2;
- c) uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido, compreendendo uma área de domínio conservada A, B e/ou C, tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo de SEQ ID NO:3, 4 e 5;
- d) uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido, compreendendo uma área D, tendo pelo menos 80% de identidade, preferivelmente, pelo menos 85% de identidade, mais preferivelmente, pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:6 (isto é, aminoácidos 40-141 da SEQ ID NO:2; ver a terceira linha na figura 3);
- e) uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido, mostrando pelo menos 80% de identidade, preferivelmente, pelo menos 85% de identidade, mais preferivelmente, pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:2; e
- f) uma sequência de ácido nucleico que codifica uma enzima pertencente à classe de enzima EC 2.5.1.27.

[0033] A invenção também inclui modalidades em que a primeira sequência de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácido compreendendo uma área de domínio conservada A', B' e/ou C', tendo uma sequência de aminoácido de domínio A', B' e/ou C' de *Arabidopsis thaliana*, conforme mostrado na Figura 2.

[0034] Os genes que codificam a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina (IPTs) são encontrados em diversos gêneros e espécies de plantas, como, por exemplo, nas angiospermas e gimnospermas. Quando as sequências de aminoácidos das IPTs foram comparadas, homologias bastante semelhantes foram encontradas em domínios específicos em diferentes gêneros de plantas (ver, por exemplo, o documento de patente WO 2006/034286). Portanto, é possível encontrar IPTs de diferentes gêneros e espécies de plantas que funcionam de maneira similar a dos genes aqui descritos.

[0035] A análise de sequência feita por Kakimoto (2001) de IPTs de *Arabidopsis*, AtIPT1-9, em comparação com as IPTs de *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* e *Pantoea agglomerans*, revelou três padrões de consenso: domínio A (SEQ ID NO:3), domínio B (SEQ ID NO:4) e domínio C (SEQ ID NO:5). Os padrões de consenso são mostrados na Figura 2, onde X indica qualquer resíduo de aminoácido, (X) significa um resíduo de aminoácido não necessário, os colchetes indicam qualquer um dos resíduos de aminoácidos entre os colchetes []. As correspondentes áreas de domínio A', B' e C' de 9 diferentes IPTs de *Arabidopsis thaliana* são também mostradas na Figura 2.

[0036] Domínios similares conservados (apresentados na forma sombreada) também estão presentes nos ortólogos mais próximos AtIPT7, identificados de genomas de *Populus trichocarpa* (PtIPT7a eugene3.00041149;

PtIPT7b eugene3.00080280; PtIPT5a fgenes4_pg.C_LG_X000229; PtIPT5b_fgenes4_pg.C_LG_VIII001825) e *Eucalyptus grandis* (Eucgr.B01146; Eucgr.G00473; Eucgr.G01887; Eucgr.H03602), conforme mostrado na Figura 3.

[0037] Na conceituação da filogenética, as árvores de distância média AtIPT7 e AtIPT5 foram mostradas para a formação conjunta de um clado. A AtIPT5 parece estar mais próxima do ortólogo de *Arabidopsis* do que a AtIPT7. Entre os ortólogos de AtIPT7, a sequência de consenso, chamada aqui de área de consenso D, com identidade de similaridade superior a 50% é mostrada na Figura 3 (onde as letras maiúsculas indicam aminoácidos com 100% de identidade, enquanto que as letras minúsculas indicam aminoácidos idênticos em 50-90% das sequências comparadas). Na ITP7 da *Arabidopsis thaliana*, os aminoácidos 40-141 correspondem à sequência conservada, terceira linha na figura 3 (na Listagem de Sequência SEQ ID NO:6).

[0038] Métodos de alinhamento de sequências de aminoácido nucleico são bem conhecidos para um especialista versado na técnica, por exemplo, o método do algoritmo de Smith-Waterman (modificado para intensificação de velocidade), para calcular o alinhamento local de duas sequências. O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que é a ferramenta de maior utilidade para determinação da identidade, é um algoritmo para comparação da informação de sequência biológica primária, tal como, as sequências de aminoácido de diferentes proteínas ou os nucleotídeos de sequências de DNA.

[0039] Um programa BLAST possibilita a um pesquisador comparar uma sequência de consulta com uma biblioteca ou banco de dados de sequências, e identificar as sequências de biblioteca que se assemelham à sequência de consulta acima de um certo limite. Diferentes tipos de

programas BLAST são disponíveis, de acordo com as sequências de consulta. O programa BLAST foi projetado por Stephen Altschul (Altschul, 1990).

[0040] O gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina pode ser selecionado entre os genes que codificam diferentes IPTs, preferivelmente, do grupo de genes codificadores de IPTs, os quais pertencem à classe de enzima EC 2.5.1.27.

[0041] Mais preferivelmente, o gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina compreende uma área de domínio conservado, ou áreas A, B e/ou C, tendo uma sequência ou sequências de aminoácidos selecionadas do grupo de SEQ ID NO:3, 4 e 5.

[0042] Ainda mais preferivelmente, o gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina compreende uma área de domínio conservado, ou áreas A', B' e/ou C', tendo uma sequência ou sequências de aminoácidos de correspondentes áreas de domínio A', B' e/ou C', mostradas na Figura 2 de 9 IPTs de *Arabidopsis thaliana*.

[0043] Ainda, e muito mais preferivelmente, o gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina compreende uma área D tendo pelo menos 80% de identidade, preferivelmente, pelo menos 85% de identidade, mais preferivelmente, pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade, mais ainda preferivelmente, pelo menos 98% de identidade, ainda mais preferivelmente, pelo menos 99% de identidade, sendo mais preferível, 100% de identidade com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:6 (isto é, com a área correspondente na SEQ ID NO:2).

[0044] As outras áreas do gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina

podem variar em uma faixa mais ampla do que a área que codifica o domínio conservado A, B e/ou C, ou A', B' e/ou C', e/ou a área D. O percentual (%) de identidade nessas áreas pode ser inferior a 80%, inferior a 75%, inferior a 70%, inferior a 60%, ou mesmo, inferior a 50%.

[0045] Nas modalidades preferidas da invenção, um gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina codifica uma sequência de aminoácido mostrando pelo menos 80% de identidade, preferivelmente, pelo menos 85% de identidade, mais preferivelmente, pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade, mais ainda preferivelmente, pelo menos 98% de identidade, ainda mais preferivelmente, pelo menos 99% de identidade, sendo mais preferível, 100% de identidade com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:2.

[0046] Um gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina pode ser selecionado entre os genes que codificam diferentes IPTs, preferivelmente, o gene codificador de IPT7 ou de IPT5, mais preferivelmente, de IPT7.

[0047] Um gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina pode ser derivado de qualquer gênero ou espécie de planta, expressando uma enzima funcional de isopentenil-transferase biossintética de citocinina. Tipicamente, a planta é uma angiosperma, preferivelmente, uma *Arabidopsis*, uma *Betula*, uma *Populus* ou uma planta de *Eucalyptus*.

[0048] O gene efetor AT3G23630, isopenteniltransferase 7 de *Arabidopsis thaliana* (AtIPT7) é de *Arabidopsis*, e a sequência de gene e análise funcional de uma proteína de IPT de *Arabidopsis* altamente ortóloga, AtIPT4, foi publicado por Kakimoto, em 2001.

[0049] A presente invenção foi exemplificada mediante uso do gene codificador IPT7 da enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina de *Arabidopsis* (gene AT3G23630), SEQ ID NO:1. O dito gene codifica a sequência de aminoácido SEQ ID NO:2. Quando a sequência de aminoácido SEQ ID NO:2 foi comparada com IPTs de outras fontes, foi descoberto que homologias similares podem ser encontradas na área de domínio D, área de domínio B e/ou na área de domínio C, ou entre diferentes IPTs na *Arabidopsis thaliana*, e também que homologias similares podem ser encontradas na área de domínio A', área de domínio B' e/ou na área de domínio C' (ver as Figuras 2 e 3). O percentual (%) de identidade dessas áreas entre sequências de aminoácidos de diferentes origens é de pelo menos 80%, preferivelmente, pelo menos 85%, mais preferivelmente, pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente, pelo menos 95%, mais ainda preferivelmente, pelo menos 97%, muito mais preferivelmente, pelo menos 98%, mais ainda preferivelmente, pelo menos 99%, sendo mais preferível, 100% de identidade.

[0050] Portanto, na presente invenção é possível o uso de genes que funcionam de maneira similar ao gene IPT7 da *Arabidopsis*, de diversos outros gêneros e espécies de plantas e/ou de diferentes IPTs. Também, é possível o uso de sequências de ácido nucleico compreendendo substituições, inserções, deleções, ou outras modificações, comparadas à SEQ ID NO:1, desde que a sequência de ácido nucleico codifique a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina, preferivelmente, pertencente à classe de enzima EC 2.5.1.27. Mais preferivelmente, a enzima pertence à IPT7.

[0051] As sequências de ácido nucleico que codificam as enzimas isopentenil-transferase biossintéticas de citocinina e que são usadas nas construções genéticas conforme aqui descrito, tipicamente, são sequências isoladas de sua origem, por exemplo, a IPT7 de *Arabidopsis thaliana* é usada em uma construção genética introduzida em células de *Populus*, para promover o crescimento de uma árvore transgênica de *Populus*. No entanto, é também possível intensificar a expressão de sequências endógenas de ácido nucleico e sequências que codificam IPTs.

[0052] A construção genética de acordo com a presente divulgação compreende uma segunda sequência de ácido nucleico, que é um promotor que permite a expressão da enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina em células meristemáticas de uma planta. Preferivelmente, o promotor permite a expressão em células cambiais e células apicais, mais preferivelmente, especificamente em células cambiais.

[0053] O termo "promotor" tem o significado de uma região de DNA que se liga a uma polimerase de RNA, e que direciona a enzima para o apropriado local de iniciação da transcrição, para uma particular sequência de polinucleotídeo. Um promotor, além disso, pode compreender outras sequências de reconhecimento, referidas como elementos promotores a montante, que influenciam a velocidade de iniciação da transcrição.

[0054] Um exemplo de um promotor que permite a expressão em células meristemáticas no câmbio e em células apicais é o promotor de meristema de bétula, pBpCRE1. O promotor é preferivelmente definido pela SEQ ID NO:7 (GenBank EU583454, Nieminen et al., 2008). Outro exemplo de um promotor que permite a expressão em células meristemáticas é um promotor que permite a expressão

especificamente em células cambiais. Esse promotor que especificamente se expressa em células cambiais é o promotor cambial específico de *Populus*, pLM5, preferivelmente, definido pela SEQ ID NO:8 (o promotor pLM5 é descrito também no documento de patente WO 2004/097024A1, como SEQIDNO4 LMX5 A055P19U).

[0055] Na construção genética, a primeira sequência de ácido nucleico (efetor) é operacionalmente ligada à segunda sequência de ácido nucleico (promotor). O termo "operacionalmente ligada" significa que dois elementos genéticos são ligados por uma ligação funcional, por exemplo, um gene efetor é operacionalmente ligado a um promotor, que permite a expressão do gene efetor.

[0056] Uma construção genética pode também conter um marcador selecionável para a seleção de células compreendendo a construção genética introduzida. Marcadores selecionáveis incluem, por exemplo, resistências aos antibióticos de ampicilina, carbenicilina e resistência à higromisina B.

[0057] Na presente divulgação, a ligação do promotor e efetor foi exemplificada pelo promotor pLMX5, que foi operacionalmente ligado ao gene efetor, pela inserção do mesmo na proximidade do gene efetor, no local de clonagem da 2ª. caixa do Gateway (Figura 4).

[0058] Os seguintes primers de clonagem de Gateway foram usados:

- primer IPT7_Fwd GW:

ACAAAAAGCAGGCTTAATGAAGTTCTCAATCTCA (SEQ ID NO:9)

- primer IPT7_REV GW:

TACAAGAAAGCTGGGTATCATATCATATTGTGGG (SEQ ID NO:10)

[0059] Quando a construção LMX5::At1PT7 (SEQ ID NO:11) foi introduzida dentro das árvores, as árvores transgênicas com a construção LMX5::At1PT7 exibiram uma

superexpressão ectópica de adenosina fosfato-isopenteniltransferase 7 de *Arabidopsis thaliana* (IPT; EC 2.5.1.27), expressa na zona cambial através do promotor LMX5 (descrito no artigo de Love et al., 2009). Nas árvores transgênicas, a sinalização da citocinina foi estimulada pelo aumento da quantidade do hormônio de citocinina da planta na zona cambial. A enzima de adenosina fosfato-isopenteniltransferase 7 (AtIPT7) de *Arabidopsis thaliana* catalisa a primeira reação (limitadora de velocidade) na rota da biossíntese de isopreno-citocininas. A AtIPT7 é expressa no tecido vascular na *Arabidopsis* (Sakakibara, 2006).

[0060] Na Figura 4 são apresentadas as seguintes regiões:

- Borda esquerda, LB: *Agrobacterium tumefaciens*; 25 bp; local de reconhecimento para os genes de virulência no plasmídeo Ti; início da inserção (parte do plasmídeo transferido para dentro do genoma da planta). Posição inicial, a 1ª. bp. ColE1 (replícon): parte do plasmídeo de *Escherichia coli*, pBR322; 615 bp; amplificação das culturas bacterianas (não expressa nas plantas transgênicas);
- gene- β -lactamase(*bla*): parte do plasmídeo de *Escherichia coli*, pBR322; 861 bp; o gene proporciona resistência à ampicilina/carbenicilina em culturas bacterianas (não expressa nas plantas transgênicas);
- *pLMX5*: álamo tremedor híbrido (*Populus tremula***P. tremuloides*); 1807 bp; promotor usado para a superexpressão do gene da enzima adenosina fosfato-isopenteniltransferase 7 (AtIPT7). Posição inicial, o 3000^{ésimo} bp.
- *attB1*: sintético (disponível da Cia. Invitrogen; 19 bp; local de recombinação conforme a técnica Gateway;

- Gene codificador da enzima *Adenosina fosfato-isopenteniltransferase 7 (AtIPT7)*: *A. Thaliana*; 990 bp; Posição inicial, o 4858^{ésimo} BP;
- *AttB*: sintético (disponível da Cia. Invitrogen; 19 bp; local de recombinação conforme a técnica *Gateway*;
- *pAnos* (região 3' não codificadora do gene *nopaline-sintase*: *A. tumefaciens*; ca. 200 bp⁽¹⁾; sinal de poliadenilação (sinal para o fim da transcrição) para os genes *ERF*;
- *pnos*, *A. tumefaciens*; ca. 200 bp⁽¹⁾; promotor para expressão do gene de *higromicinfosfo-transferase (hpt)*;
- *hpt*; *E. coli*; 1000 bp⁽¹⁾; o gene proporciona uma resistência para a higromisina B usada para a seleção;
- *pAg4* (T_L-DNA:gene n 4): *A. tumefaciens*; cerca de 200 bp⁽¹⁾; sinal de poliadenilação para o gene *hpt*;
- RB (Borda direita): *Agrobacterium tumefaciens*; 25 bp; região de reconhecimento dos genes de virulência no plasmídeo Ti; fim da inserção do genoma de planta. ⁽¹⁾ Nos artigos de referência originais (Walden et al., 1990; Koncz et al., 1994) o tamanho do local não é definido e não pode ser deduzido de outras fontes.
- vetor *backbone*, similar ao vetor de reparação de espaçamento binário de *Agrobacterium*, pGAP-Hyg, (Sequência completa: Sequência ID: gb|EU933993.1, comprimento: 7942) e ao pBR322.

[0061] Para introduzir a construção genética em uma planta, um vetor é normalmente necessário. Um vetor adequado é, por exemplo, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

[0062] Existem também outros sistemas disponíveis para introdução de material genético em plantas. Esses sistemas não necessariamente precisam de um vetor. Assim, é possível, por exemplo, introduzir material genético em

espécies de angiosperma e gimnosperma através da reprodução sexual entre árvores e mediante bombardeamento de partículas (partículas de ouro cobertas de DNA são atiradas dentro das células).

[0063] A presente invenção proporciona uma árvore que superexpressa uma sequência endógena de ácido nucleico, a qual codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina, ou expressa uma sequência exógena de ácido nucleico, a qual codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina.

[0064] Conforme aqui descrito, o gene efetor precisa ser expresso nas células cambiais. Isso é possível mediante uso de um promotor, que, geralmente, permite a expressão nas células meristemáticas. No entanto, é desvantajoso que a divisão celular seja intensificada em quaisquer células meristemáticas. Se, por exemplo, as folhas de uma árvore crescem ou se compactam demasiadamente, isso pode ser desvantajoso, embora o volume do caule tenha sido aumentado, ao mesmo tempo. De acordo com a presente divulgação, um promotor que permite a expressão em células cambiais e em células apicais é preferivelmente usado, uma vez que o crescimento global da árvore não é muito grande, somente o crescimento do volume do caule e o crescimento da altura. De uma forma mais preferível é usado um promotor, o qual permite a expressão especificamente nas células cambiais. Nesse caso, o crescimento do volume do caule é aumentado, mas, não o crescimento global da árvore e nem a sua altura. Todas as comparações são pretendidas para serem feitas com relação a uma árvore do tipo selvagem, de mesma espécie, idade e condições de crescimento.

[0065] O gene efetor pode ser introduzido em uma árvore mediante uso de uma construção genética, conforme

aqui descrito. Alternativamente, a expressão de um gene efetor do tipo endógeno em uma árvore pode ser aperfeiçoada. Assim, por exemplo, na árvore da espécie *Populus*, a expressão da IPT7 da *Populus* pode ser melhorada.

[0066] A expressão do gene pode ser intensificada através da superexpressão ectópica, conduzindo o gene endógeno através de um promotor alternativo, ou seja, conduzindo um maior nível de expressão do que aquele do promotor endógeno. Isso pode ser feito mediante introdução de uma nova cópia do gene endógeno, de acordo com o promotor escolhido, dentro do genoma. Alternativamente, a expressão do gene endógeno pode ser intensificada através de marcação de ativação, em que os elementos intensificadores são introduzidos dentro do genoma da planta, onde são capazes de intensificar a transcrição dos genes nas suas proximidades. No futuro, uma expressão mais intensa do gene endógeno pode ser também alcançada através da montagem de genoma, por exemplo, com nucleases de engenharia, que podem ser usadas para eliminar elementos silenciadores que reprimem a expressão dos genes desejados.

[0067] Uma árvore transgênica produzida conforme aqui descrito expressa pelo menos 40%, preferivelmente, pelo menos 44%, mais preferivelmente, pelo menos 46%, ainda mais preferivelmente, pelo menos 50%, muito mais preferivelmente, pelo menos 60%, de níveis mais altos de sinalização de citocinina nas células cambiais durante o desenvolvimento cambial, quando se compara a uma árvore do tipo selvagem (WT).

[0068] Além disso, em uma árvore transgênica produzida conforme aqui descrito, o crescimento de volume do caule na dita árvore é pelo menos 35% maior, preferivelmente, pelo menos 38%, mais preferivelmente, pelo menos 40%, ainda mais preferivelmente, pelo menos 45%, e

muito mais preferivelmente, pelo menos 50% maior, quando se compara a uma árvore do tipo selvagem (WT).

[0069] Em um aspecto da invenção, a árvore que expressa um gene efetor nas células cambiais, preferivelmente, pertence à espécie das angiospermas. A árvore é uma árvore de período anual ou uma árvore perene, preferivelmente, uma árvore perene. A árvore pertence aos gêneros *Betula*, *Populus* ou *Eucalyptus*. Preferivelmente, a árvore pertence ao gênero *Populus*. A árvore do gênero *Populus* é selecionada do grupo de espécies de *Populus*, por exemplo, *P. tremula*, *P. alba*, *P. tremuloides*, *P. canescens*, *P. deltoids*, *P. fremontii*, *P. nigra*, *P. Canadensis*, *P. inopina* e *Populus tremula x tremuloides*. A função da construção genética foi testada e confirmada no álamo tremedor híbrido e *Populus tremula x tremuloides*.

[0070] Em um segundo aspecto da invenção, a árvore expressa um gene efetor nas células cambiais pertencentes às gimnospermas. A árvore, preferivelmente, é um abeto vermelho ou um pinheiro.

[0071] A presente invenção também inclui diversos produtos de madeira, os quais podem ser obtidos a partir de árvores transgênicas, conforme a invenção. Esses produtos de madeira incluem, por exemplo, troncos, galhos, raízes e sementes.

[0072] A presente invenção também proporciona um método para produção de uma planta transgênica, capaz de aumentar a produção de biomassa, e/ou aumentar o crescimento de volume do caule, quando se compara a uma planta do tipo selvagem. O método compreende as etapas de:

- introdução de uma sequência de ácido nucleico codificadora da enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a um

promotor que permite a expressão nas células cambiais, para uma célula de árvore;

- cultivo da dita célula para formar uma cultura celular;
- regeneração da cultura celular em uma planta, na qual a sequência de ácido nucleico que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina é expressa nas células cambiais, durante o desenvolvimento cambial.

[0073] Métodos de transformação baseados em bactéria *Agrobacterium* para árvores de espécie angiosperma foram publicados em diversos artigos, por exemplo, artigos de Haggman et al., 2003, Seppanen et al., 2004 e Nilsson et al., 1992. Em geral, o método compreende que explantes de plantas (discos de folhas, segmentos de caules, etc.) são incubados em uma cultura de *Agrobacterium*, após o que são conjuntamente cultivados com a bactéria de *Agrobacterium* em um meio de cultura sólido. Para finalizar a cultura conjunta, as bactérias de *Agrobacterium* são removidas por meio de lavagem. Os explantes de plantas são cultivados em um meio de produção de calo, suplementado com um antibiótico, para limitar a produção de calo nas plantas transgênicas que abrigam o gene de resistência a antibiótico. Os tecidos de formação de calo são transferidos para um meio de regeneração, para a produção de brotos. Os brotos regenerados são transferidos para um meio de indução de raiz. Após as raízes serem formadas, as plantinhas ou mudas podem ser cultivadas no solo.

[0074] A presente invenção proporciona ainda um método para melhorar a produção de biomassa e/ou aumentar o crescimento de volume de caule em árvores. O método compreende as etapas de:

- introdução de uma sequência de ácido nucleico codificadora da enzima isopentenil-transferase

biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a um promotor que permite a expressão nas células cambiais, para uma célula de árvore;

- cultivo da dita célula para formar uma cultura celular;
- regeneração da cultura celular em uma planta, na qual o gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina é expresso nas células cambiais durante o desenvolvimento cambial;
- permissão à dita planta crescer para a forma de árvore adulta, tendo um intensificado crescimento radial, se comparado a uma árvore do tipo selvagem.

[0075] Na transformação mediada pela *Agrobacterium*, os explantes de plantas são conjuntamente cultivados com a bactéria *Agrobacterium* contendo o desejado transgene. A bactéria *Agrobacterium* irá transformar as células de plantas nos explantes através da integração do DNA transgênico no genoma da planta. Colocadas em meios de enraizamento e formação de brotos, as plantas transgênicas serão regeneradas a partir das células transformadas.

[0076] No método de bombardeio de partículas (microprojétil), partículas de ouro ou tungstênio são revestidas com DNA e atiradas dentro das células das plantas. O DNA inserido irá se integrar dentro do genoma da planta.

[0077] No método de eletroporação, furos transitórios são formados nas membranas do protoplasto da planta mediante uso de choque elétrico; isso permite ao DNA transgênico entrar nos protoplastos da planta.

[0078] No método de transformação viral (transdução), o transgene desejado é empacotado em um adequado vírus de planta, e a planta é infectada por esse vírus. O material transgênico irá se integrar dentro do genoma da planta.

[0079] O termo "aumento de produção de biomassa" significa aqui a quantidade adicional de biomassa (massa em peso seco do caule) das árvores transgênicas, quando se compara com árvores do tipo selvagem e da mesma idade.

[0080] Na presente descrição, a massa seca de tronco de árvores do tipo WT foi medida na idade de 16 semanas (média de 3 árvores) e foi de 35 ± 2 (STDEV) g, enquanto o tronco das árvores de pLMX5-IPT7 (3 árvores) foi de 51 ± 8 g.

[0081] O termo "aumento de crescimento do volume de caule" significa aqui a quantidade adicional de volume de caule nas árvores transgênicas, quando se compara com árvores do tipo selvagem e da mesma idade.

[0082] Na presente descrição, o volume de caule foi medido uma vez por semana, com 3 pontos de medições (10 cm acima do nível do solo, na metade da árvore, 2 cm abaixo do ápice), e o volume foi calculado através da fórmula de formação de frutos (*fructa*) (soma do basal até a metade e da metade para o ápice):

$$V = \pi h / 3 * (r^2 + rR + R^2)$$

em que:

V = volume

h = altura

r = raio da parte superior

R = raio da parte inferior

<http://www.mathwords.com/f/frustum.htm>.

[0083] As árvores transgênicas de superexpressão de IPT7 apresentaram um maior volume de caule se comparado com as árvores do tipo selvagem (WT) (Figura 5). O crescimento do volume de caule nas árvores transgênicas foi, em média, 53% maior, e pelo menos 38% maior, se erros padrões foram levados em consideração.

[0084] As árvores transgênicas expressaram, em média, 83% e, pelo menos 44%, se os erros padrões foram levados em consideração, com maiores níveis de sinalização de citocinina nas células cambiais durante o desenvolvimento cambial, se comparado com as árvores do tipo selvagem (WT).

[0085] A presente invenção inclui ainda aplicações em que a árvore transgênica é uma árvore estéril, incapaz do desenvolvimento de flores, polinização ou semente. Os métodos usados para produzir árvores estéreis são conhecidos para um especialista versado na técnica.

[0086] Clones estéreis de híbridos entre duas espécies correlacionadas com diferentes números de cromossomos (tetraploide cruzado com diploide, proporcionando, por exemplo, um triploide estéril) podem ser selecionados para transformação. As árvores transgênicas podem ser propagadas por meio de clone e testadas quanto à esterilidade (em relação a um desenvolvimento abolido, abortado ou estéril de produção de flores, pólen ou sementes).

[0087] Para exemplificar a presente invenção, a construção de árvores transgênicas exibindo um elevado nível de sinalização de citocinina é aqui descrito. Nessas árvores, a situação e o padrão de distribuição e sinalização de auxina e citocinina foram analisados.

[0088] A concentração dos perfis de auxina e citocinina através do meristema cambial no caule da *Populus* foi caracterizada. Além disso, para correlacionar o perfil hormonal da citocinina com a sinalização da citocina, uma intensa análise dos perfis de expressão da citocinina biossintética e dos genes de sinalização através da zona cambial da *Populus* foi feita.

[0089] Para melhor entender a interação entre dois principais percursos hormonais, citocinina e auxina, na regulação das divisões da célula cambial, seus níveis de concentração através da zona cambial do caule da *Populus trichocarpa* foram analisados. Seções criogênicas do caule representando o floema, condução do floema, desenvolvimento do floema, câmbio, desenvolvimento do xilema, e tecidos do xilema (Figura 6) foram analisadas.

[0090] Para verificar a identidade do tecido das seções criogênicas analisadas, genes marcadores para diversos tipos de tecidos foram incluídos na análise. O gene *PtSUC2* foi usado como marcador da célula de floema, o gene *PtANT*, como marcador para divisão das células cambiais, e o gene *PtCOMT2* como marcador para fibras de floema e células de xilema. Os marcadores se correlacionaram satisfatoriamente com a identidade dos tecidos determinada através de microscopia, durante o seccionamento criogênico.

[0091] A presente invenção é baseada em uma análise detalhada da função da citocinina na regulação do desenvolvimento cambial em um caule de árvore. De modo similar à auxina, o hormônio de citocinina também apresenta um gradiente de concentração através da zona cambial. O pico de concentração da citocinina coincide com o alto domínio de expressão dos genes biossintéticos e de sinalização desse hormônio.

[0092] Com exceção dos genes *PtCKI1*, a expressão de todos os componentes da biossíntese da citocinina e do percurso de transdução de sinal no câmbio da *Populus* foi detectada. Foi verificado que o efetivo nível de expressão dos genes *CKI1* é bastante baixo, abaixo do limite de detecção da análise de expressão, ou que esses genes não

são exigidos para o desenvolvimento cambial durante o crescimento ativo das árvores *Populus*.

[0093] A expressão de todos os componentes de sinalização da citocinina confirma a importância desse percurso hormonal de sinalização para a atividade do câmbio vascular.

[0094] De modo interessante, o perfil de distribuição cambial da citocinina é diferente, mas, parcialmente, se sobrepõe aos perfis de concentração da auxina. A alta concentração da auxina é restrita ao domínio da divisão ativa de células cambiais não diferenciadas; enquanto a alta concentração da citocinina apresenta um maior domínio, que se estende a partir do câmbio não diferenciado para o floema em desenvolvimento.

[0095] Na presente divulgação foi mostrado que o acúmulo de biomassa no caule da árvore pode ser intensificado através da estimulação da sinalização da citocinina nas árvores transgênicas *Populus*. Essas árvores mostraram uma acentuada capacidade de resposta da citocinina juntamente com um elevado nível de sinalização da citocinina. A atividade de divisão da célula cambial das árvores transgênicas foi aumentada, se comparado com as árvores do tipo selvagem (WT) e, respectivamente, o crescimento radial do caule foi acelerado. Como essas árvores foram da altura das árvores do tipo selvagem (WT), o efeito estimulatório da citocinina sobre o crescimento radial foi independente da velocidade de crescimento apical. Além disso, essa ação estimulante da citocinina pareceu ocorrer mediante interferência indesejada (*crosstalk*/diafonia) entre a CK e a auxina: uma elevada concentração e sinalização de CK aumentou o nível e ampliou o domínio de concentração e sinalização da auxina na região cambial. Potencialmente, os domínios que se sobrepõem

parcialmente da ação da auxina e citocinina apresentam funções específicas na regulação de diferentes processos de desenvolvimento que ocorrem ao longo da zona cambial. A interferência indesejada entre a auxina e a citocinina na parte intermediária do câmbio pode definir o nicho da célula do caule para a manutenção de um grupo de célula de divisão ativa. Assim, possivelmente a alta proporção de citocinina para auxina no lado do floema da zona cambial contribui para a determinação da identidade do floema das células vasculares em desenvolvimento.

[0096] A invenção é ilustrada pelos exemplos não limitativos apresentados a seguir. A invenção pode ser aplicada a outros genes, construções genéticas e plantas, diferentes daquelas ilustradas nos exemplos apresentados. No entanto, deve ser entendido que as modalidades apresentadas na presente descrição e nos exemplos são apenas de caráter ilustrativo, pelo que, diversas permutas e modificações podem ser possíveis, desde que dentro do escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Construção de árvores transgênicas *Populus* com estimulada sinalização cambial da citocinina.

[0097] Para estudar o efeito da sinalização da citocinina com relação ao crescimento do caule foram construídas árvores transgênicas *Populus* (*P. tremula* x *tremuloides*) para demonstrar uma elevada sinalização da citocinina durante o desenvolvimento cambial. Para estimulação da biossíntese foi usado o gene *At1PT7* de *Arabidopsis*, que codifica a enzima isopenteniltransferase biossintética de citocinina. O gene *AtIPT7* foi expresso sob o promotor cambial específico *PttLMX5* (Love et al., 2009), que mostra uma alta expressão nas células cambiais e células de xilema em desenvolvimento. Nenhuma expressão de

AtIPT7 foi detectada nas linhas transformadas. Duas linhas (*AtIPT7* 1 e 3) com um alto nível de expressão transgênica foram selecionadas para posterior análise.

Exemplo 2 - Crescimento radial acelerado de troco de árvore nas linhas transgênicas.

[0098] Para avaliar o efeito da atividade de *AtIPT7* com relação ao desenvolvimento da árvore, foram estudadas dinâmicas de crescimento de árvores transgênicas sob condições de estufa (Figura 5A). A velocidade de crescimento apical das linhas *pLMX5::AtIPT7* foi similar à das plantas de tipo selvagem; as plantas transgênicas apresentaram a mesma altura que aquela das árvores de controle com a mesma idade (Figura 5A). Por outro lado, o diâmetro do caule foi aumentado nas árvores transgênicas, se comparado com as árvores do tipo selvagem (WT). Foi ainda observado que o volume do caule, que foi aferido como um volume aditivo de internódulos sem as folhas, foi maior que aquele das árvores do tipo selvagem (WT) (Figura 5B).

[0099] A Figura 5A mostra os fenótipos de árvore do tipo selvagem (WT) e de linhas 1 e 3 de árvores *Populus*, *pLMX5-IPT7*, com a idade de três meses. Todas as árvores tinham alturas semelhantes.

[0100] A Figura 5B mostra o volume de tronco das linhas 1 e 3 de *Populus* transgênica, *pLMX5-IPT7*, quando comparado com as árvores WT. O volume total de caule das linhas transgênicas foi aumentado, se comparado com o volume das árvores WT. Os valores correspondem a médias (\pm SD) de cinco árvores individuais, por cada linha.

Exemplo 3 - Capacidade de resposta intensificada de citocinina relativa às linhas transgênicas.

[0101] Para avaliar o efeito da expressão cambial de *AtIPT7* sobre a sinalização da citocinina, foi testada a capacidade de resposta da citocinina em árvores

transgênicas. No ensaio clássico de capacidade de resposta da citocinina (Skoog & Miller, 1957), uma baixa proporção de citocinina para auxina induz a regeneração de raiz de segmentos de plantas, e uma alta proporção de citocinina para auxina promove, em vez disso, a regeneração do broto. Nesse ensaio, segmentos de brotos foram cortados de linhas transgênicas cultivadas em estufa e de linhas de árvores do tipo selvagem (WT), com seguinte cultivo em condições *in vitro*, em um meio com uma concentração variável de trans-Zeatin (tZ).

[0102] No ensaio, a maior parte dos segmentos de caule de linhas de *IPT7* produziram brotos mesmo com a concentração de 0,5 mg/L de trans-Zeatin (tZ), enquanto somente poucas amostras de árvores do tipo selvagem (WT) foram capazes disso (Figura 5C). Esse resultado indica que as linhas transgênicas exibem um elevado nível basal de sinalização de citocinina, mesmo que uma moderada concentração de citocinina aplicada possa induzir a produção de brotos; um típico fenótipo de resposta de citocina. Além disso, as linhas transgênicas produziram raízes no meio usado com 0 mg/L de tZ. Quando a auxina, juntamente com a citocinina, promove a formação de raiz, o resultado indica que essas linhas podem ter tido mais citocinina e auxina do que as árvores de controle.

[0103] A Figura 5C ilustra o ensaio de capacidade de resposta da citocinina de árvores WT e de linhas de árvores *pLMX5-IPT7*. Segmentos de caule foram cultivados em um meio com 0,5 mg/L de auxina (IAA) e 0, 0,5 ou 1.5 mg/L de citocinina-t-zeatin. As linhas transgênicas regeneraram brotos com baixas concentrações de citocinina (0,5 mg/L), enquanto as árvores do tipo selvagem (WT) exigiram uma concentração mais alta (1.5 mg/L) desse hormônio.

Exemplo 4 - Elevados níveis de sinalização cambial de citocinina em árvores transgênicas.

[0104] A situação da sinalização cambial da citocinina nas árvores transgênicas foi estudada. Os níveis de expressão de dois genes marcadores de citocinina foram analisados. Dois genes marcadores foram usados para avaliar o nível de sinalização da citocinina: um receptor de citocinina *PttHK3a* e um regulador de resposta do tipo (A), *PttRR7*. O nível de sinalização de auxina foi estudado através de um gene marcador de sinalização de auxina (*PttIAA3*). O regulador de resposta *PttRR7* representa um gene de resposta primário de citocinina *fosforelay*: a expressão de genes reguladores de resposta do tipo A é suprarregulada pela sinalização da citocinina: o nível de expressão desse gene reflete o nível de resposta de citocinina que ocorre nas árvores analisadas. Nas linhas IPT7, a expressão do receptor de citocinina *PttHK3a* foi essencialmente a mesma que das árvores do tipo selvagem (WT), enquanto que os níveis de expressão de *PttRR7* e *PttIAA3* foram elevados (Figura 5D).

[0105] A Figura 5D ilustra a expressão de um receptor de citocinina (*PttHK3a*), um gene de resposta primário de sinalização de citocinina (tipo-A RR *PttRR7*), e um gene marcador de sinalização de auxina (*PttIAA3*) no caule de árvore selvagem (WT) e linha 1 de pLMX5-IPT7. Os níveis de expressão de *PttRR7* e *PttIAA3* foram elevados na linha de pLMX5-IPT7, se comparado com a WT, enquanto a expressão de *PttHK3a* não foi afetada. Duas árvores individuais por linha foram analisadas por qRT-PCR (barras de erro = SD).

[0106] Esse resultado mostra que o nível de sinalização de citocinina e auxina foram elevados com

sucesso mediante uma elevada concentração de CK, enquanto a capacidade para percepção da citocinina não foi modificada. Exemplo 5 - Aumento do número de divisões de células cambiais em árvores transgênicas.

[0107] Para estudar o efeito de elevada sinalização de citocinina sobre a arquitetura vascular, a anatomia cambial de árvores transgênicas foi analisada. Células cambiais meristemáticas não diferenciadas foram definidas nas seções transversais na forma de células pequenas e planas, de parede fina, localizadas em arquivos de células cambiais entre as células de diferenciação de xilema e floema. As primeiras células de diferenciação de xilema e floema foram definidas como tendo um tamanho maior e arredondado. Nas árvores IPT7, o câmbio vascular continha mais células meristemáticas nos arquivos de células cambiais do que as árvores do tipo selvagem (24 vs 15) (Figuras 6A e 6B). Com base no aumento do número de células, pode ser concluído que os arquivos de células cambiais foram submetidos a adicionais divisões celulares, se comparado com as árvores WT.

[0108] Além disso, foi estudado se além da estimulação da velocidade da divisão celular, o elevado nível de sinalização da citocinina também possa ter afetado a morfologia das células de xilema produzidas. Para confirmar isso, as dimensões das células de xilema, dos vasos e das fibras foram analisadas em amostras de caule macerado. Quando comparado com as árvores WT, a extensão e largura das células de xilema nas árvores IPT7 não foram significativamente diferentes.

Exemplo 6 - Elevada sinalização da citocinina afeta o domínio de sinalização cambial da auxina.

[0109] Em seguida, foi estudado como a regulação hormonal do meristema cambial reage a uma elevada

concentração de citocinina. Para realização desse estudo, a dinâmica de sinalização do hormônio cambial foi perfilada através de estudos sobre a concentração hormonal e expressão de gene marcador. As concentrações de iP e tZ bioativos foram quase que 30% mais altas nas árvores transgênicas, enquanto que as concentrações de IAA e cZOG foram dobradas. De forma marcante, os perfis de distribuição de citocinina foram bastante similares entre as árvores do tipo selvagem (WT) e as árvores de linha transgênica, enquanto a forma de distribuição da auxina foi diferente. A árvore transgênica apresentou um domínio mais amplo de alta concentração de auxina: o nível de IAA foi maior no desenvolvimento do xilema e nas células de xilema do que na árvore WT.

[0110] Para conectar os perfis hormonais com o padrão de sinalização, o padrão de expressão dos genes marcadores de sinalização de auxina e citocinina foi caracterizado através da zona cambial. O gene *PttRR7* foi usado como marcador para a citocinina e o gene *PttIAA3* para sinalização da auxina. De modo similar ao estudo de concentração hormonal, seções criogênicas representando o floema, desenvolvimento do floema, câmbio, desenvolvimento do xilema e xilema, foram analisadas. Os genes *PttSUC2* e *PttCOMT* foram usados como genes marcadores para o floema, fibras de floema e células de xilema, respectivamente, para confirmar a identidade das seções. Duas árvores do tipo selvagem e duas árvores IPT7 foram analisadas. Nas árvores transgênicas e WT, ocorreram picos de expressão de RR7 no desenvolvimento do tecido de floema, onde, também, o gene marcador de floema, *PtSUC2*, apresentou uma alta expressão (Figura 6). O câmbio, onde os marcadores de floema e xilema apresentam baixos níveis de expressão, exhibe alta IAA3 e aumento dos níveis de expressão de RR7. O desenvolvimento

do tecido de xilema apresenta alta IAA3 e uma crescente expressão de COMT, enquanto que na maturação do xilema, apenas a expressão do marcador de xilema é alta.

[0111] Quando as árvores WT e as árvores transgênicas foram comparadas, foi possível observar que as árvores IPT7 apresentaram um domínio mais amplo de alta sinalização de auxina. O câmbio, que é um domínio de alta expressão de RR7 e de IAA3, e o desenvolvimento de xilema, um domínio de alta expressão de IAA3 e moderada expressão de RR7, pode também se observar que os tecidos são maiores nas linhas transgênicas, se comparado com a árvore WT (Figura 6). Esse domínio ampliado da sinalização da auxina corresponde ao aumento do número de células meristemáticas.

[0112] A anatomia cambial, o teor hormonal e os perfis de sinalização hormonal da árvore WT (A) e do caule da árvore *Populus* transgênica linha pLMX5::IPT7 linha 1 (B) são mostrados na Figura 6. Nas árvores IPT7, o câmbio vascular continha mais células meristemáticas nos arquivos de células cambiais do que no caso das árvores WT (tipo selvagem) (24 vs 15). Quatro frações (A-D) foram coletadas para a análise hormonal. Na árvore WT, a 4ª. fração representa células de xilema totalmente desenvolvidas, enquanto no caule pLMX5::IPT7 ainda existe o desenvolvimento de células de xilema, o que indica que a zona cambial meristemática é mais ampla no caule pLMX5::IPT7 do que na árvore WT.

[0113] Os perfis hormonais da auxina (IAA) e das citocininas bioativas (iP e tZ) juntamente com uma forma de armazenamento de citocinina (cZOG) foram analisados em quatro frações cambiais (A-D). As concentrações das citocininas bioativas iP e tZ foram quase 30% maiores nas árvores transgênicas, enquanto as concentrações de IAA e cZOG foram dobradas. De forma marcante, os perfis de

distribuição de citocinina foram bastante similares entre as árvores do tipo selvagem (WT) e as árvores de linha transgênica, enquanto a forma de distribuição da auxina foi diferente. A árvore transgênica apresentou um domínio mais amplo de alta concentração de auxina (destacado por um sombreamento de cor cinza).

[0114] Para correlacionar os perfis hormonais com os domínios de sinalização, padrões de expressão de genes marcadores foram analisados por meio do procedimento de qRT-PCR em quatorze seções criogênicas de floema (1), dentro de tecidos de xilema (14). As letras sob o gráfico indicam a posição de quatro frações de análise hormonal (A-D). O gene *PttSUC2* foi usado como marcador de floema, um gene de resposta primária de citocinina, *PttRR7*, como um marcador de sinalização de CK, o gene *PttIAA3* como um marcador de sinalização de auxina, e o gene *PttCOMT2* como marcador de identidade de fibra de floema e marcador de identidade de xilema. Com base na expressão de *PttRR7*, o nível de sinalização da citocinina foi elevado na árvore pLMX5::IPT7. No entanto, a amplitude do alto domínio de concentração de citocinina (frações 3-7 nas árvores WT e pLMX5::IPT7) não foi afetada. Ao contrário, o domínio cambial com alta expressão do gene marcador de auxina e decrescente expressão do gene marcador de citocinina (frações 5-7 da árvore WT vs frações 5-11 da árvore pLMX5::IPT7) foi mais amplo na linha transgênica do que na árvore WT (frações 3-7). O nível de expressão do transgene *AtIPT7* foi abaixo do limite de detecção nas árvores WT, enquanto apresentou uma alta expressão na zona cambial da árvore pLMX5::IPT7.

REFERÊNCIAS USADAS COMO CONSULTA

- Altschul SF; Gish W; Miller W; Myers EW; Lipman D.J., (1990); *Basic local alignment search tool*; National Center

for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894; *J. Mol. Biol.*; 215: 403-10 (1990).

- El-Showk S., Ruonala R., Helariutta Y., (2013); *Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk*; *Development*; Abril; 140(7): 1373-83; doi: 10.1242/dev.086371.

- Häggman H., Frey A.D., Aronen T., Ryyänen L., Julkunen-Tiitto R., Tiimonen H., Pihakaski-Maunsbach K., Jokipii S., Chen X., Kallio P.T., (2003); *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in hybrid aspen (Populus tremula x tremuloides)*; *Plant Biotechnology Journal*; 1:287-300.

- Kakimoto T., *Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethyl-allyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases*; *Plant Cell Physiol.*, Julho de 2001; 42(7):677-85.

- Koncz C., Martini N., Szabadosz L., Hroudá M., Bachmair A., Schell J., (1994), na Publicação: *Plant Molecular Biology Manual*; Editores: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (Kluwer, Dordrecht, Holanda), Volume B2, páginas 1-22.

- Love J., Björklund S., Vahala J., Hertzberg M., Kangasjärvi J., Sundberg B., (2009); *Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus*; *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106: 5984-5989.

- Nieminen K., Immanen J., Laxell M., Kauppinen L., Tarkowski P., Dolezal K., et al., *Cytokinin signalling regulates cambial development in poplar*; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008; 105:20032-7.

- Nilsson et al., (1992); *Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay*

- and non-destructive imaging*; Transgenic Research 1: 209-220.
- Sakakibara (2006), *Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation*; Annual Review of Plant Biology; 57:431-449.
 - Seppänen S.K., Syrjälä L., von Weissenberg K., Teeri T.H., Paajanen L., Pappinen A., (2004); *Antifungal activity of stilbenes in in vitro bioassays and in transgenic Populus expressing a gene encoding pinosylvin synthase*; Plant Cell Reporter, 22: 584-93.
 - Skoog F., Miller C.O., (1957); *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro*; Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-131.
 - Tuskan et al., (2006); Science. 313(5793):1596-604.
 - Walden R., Koncz C., Schell J., (1990); *The use of gene vectors in plant molecular biology*; Methods in Molecular and Cellular Biology, 4:175-194.

REIVINDICAÇÕES

1. Construção genética **caracterizada** por compreender uma primeira sequência de ácido nucleico (efetora) codificadora da enzima isopentenil-transferase 7 (IPT7) biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico (promotora), permitindo a expressão da dita primeira sequência de ácido nucleico em células cambiais,

a dita primeira sequência de ácido nucleico compreendendo a SEQ ID NO:1; e

a dita segunda sequência de ácido nucleico sendo uma promotora cambial específica, em que a expressão de IPT7 em células cambiais resulta em crescimento aprimorado do volume do caule.

2. Construção genética, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita segunda sequência de ácido nucleico é uma promotora de meristema de bétula, pBpCRE1, definida pela SEQ ID NO:7.

3. Construção genética, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita promotora é a promotora cambial específica de *Populus*, pLM5, definida pela SEQ ID NO:8.

4. Vetor **caracterizado** por compreender a construção genética conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Método para produção de uma planta transgênica, capaz de aumento de produção de biomassa, e/ou de aumento do crescimento de volume do caule, se comparado a uma planta do tipo selvagem, o método **caracterizado** por compreender as etapas de:

- introduzir uma sequência de ácido nucleico codificadora da enzima isopentenil-transferase 7 (IPT7) biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a um

promotor cambial específico que permite a expressão nas células cambiais, a uma célula de árvore;

- cultivar a dita célula para formar uma cultura celular;

- regenerar a cultura celular em uma planta, na qual a sequência de ácido nucleico que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina é expressa nas células cambiais durante o desenvolvimento cambial,

em que a dita sequência de ácido nucleico endógena compreende a SEQ ID NO:1.

6. Método para melhorar a produção de biomassa e/ou aumentar o crescimento de volume do caule em árvores, o método **caracterizado** por compreender as etapas de:

- introduzir uma sequência de ácido nucleico codificadora da enzima isopentenil-transferase 7 (IPT7) biossintética de citocinina, operacionalmente ligada a um promotor cambial específico que permite a expressão nas células cambiais, a uma célula de árvore;

- cultivar a dita célula para formar uma cultura celular;

- regenerar a cultura celular em uma planta, na qual o gene que codifica a enzima isopentenil-transferase biossintética de citocinina é expresso nas células cambiais durante o desenvolvimento cambial;

- permitir que a dita planta cresça para a forma de árvore adulta, tendo um crescimento radial aprimorado, se comparado a uma árvore do tipo selvagem,

em que a dita sequência de ácido nucleico endógena compreende a SEQ ID NO:1.

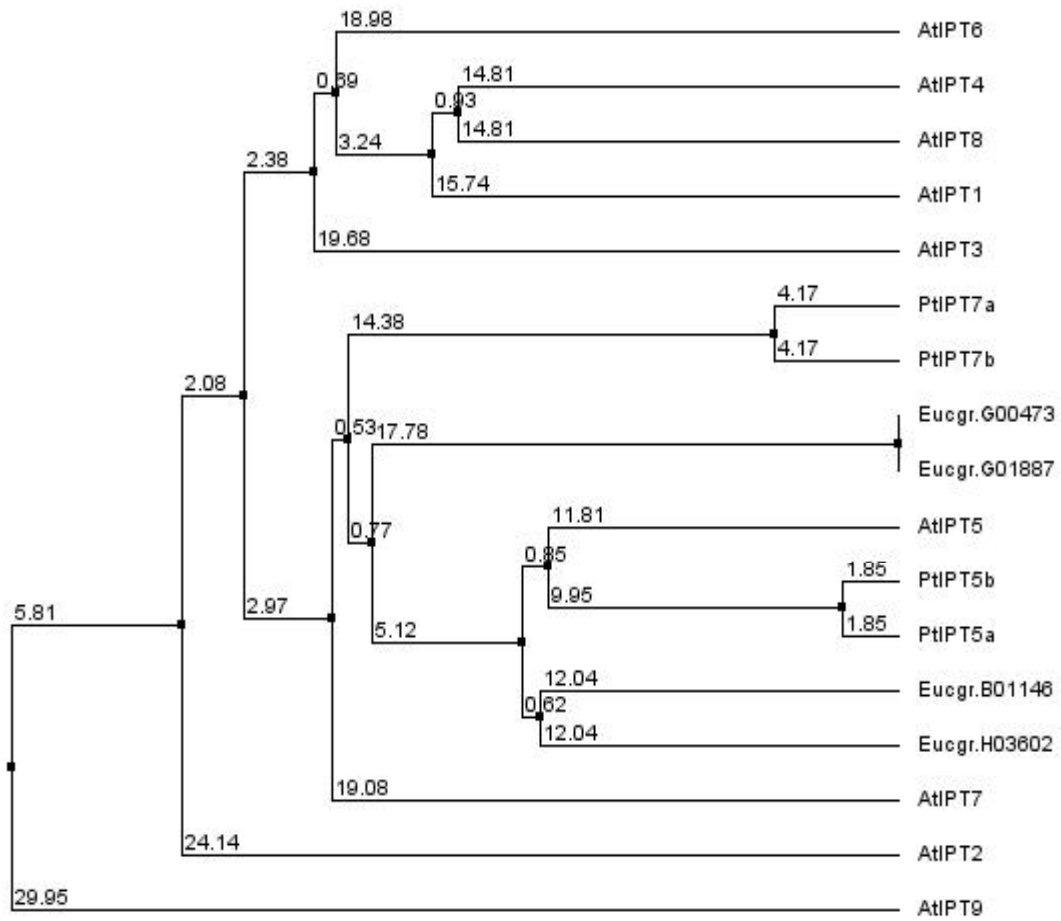


Fig. 1

domínio A	GxTxxGK[ST] (SEQ ID NO:3)
domínio A'	G[ATP]TG[STA]GKS
domínio B	[VLI]xxxxxxxx[VLI][VLI]xxDxxQ (SEQ ID NO:4)
domínio B'	[LI]Ax[RH](x)[FL]xxEI[IV][NS][SA]D[KAS][IMV]Q
domínio C	[VLI][VLI]xGG[ST] (SEQ ID NO:5)
domínio C'	[IV][IVL][AVT]GG[ST]

Fig.2

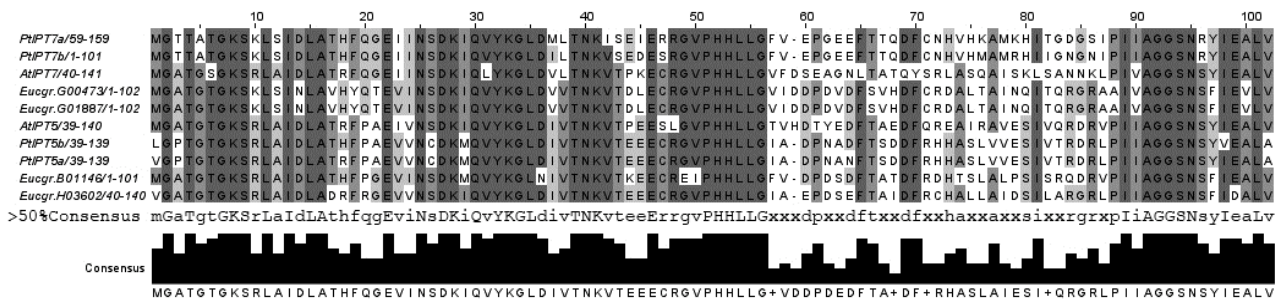
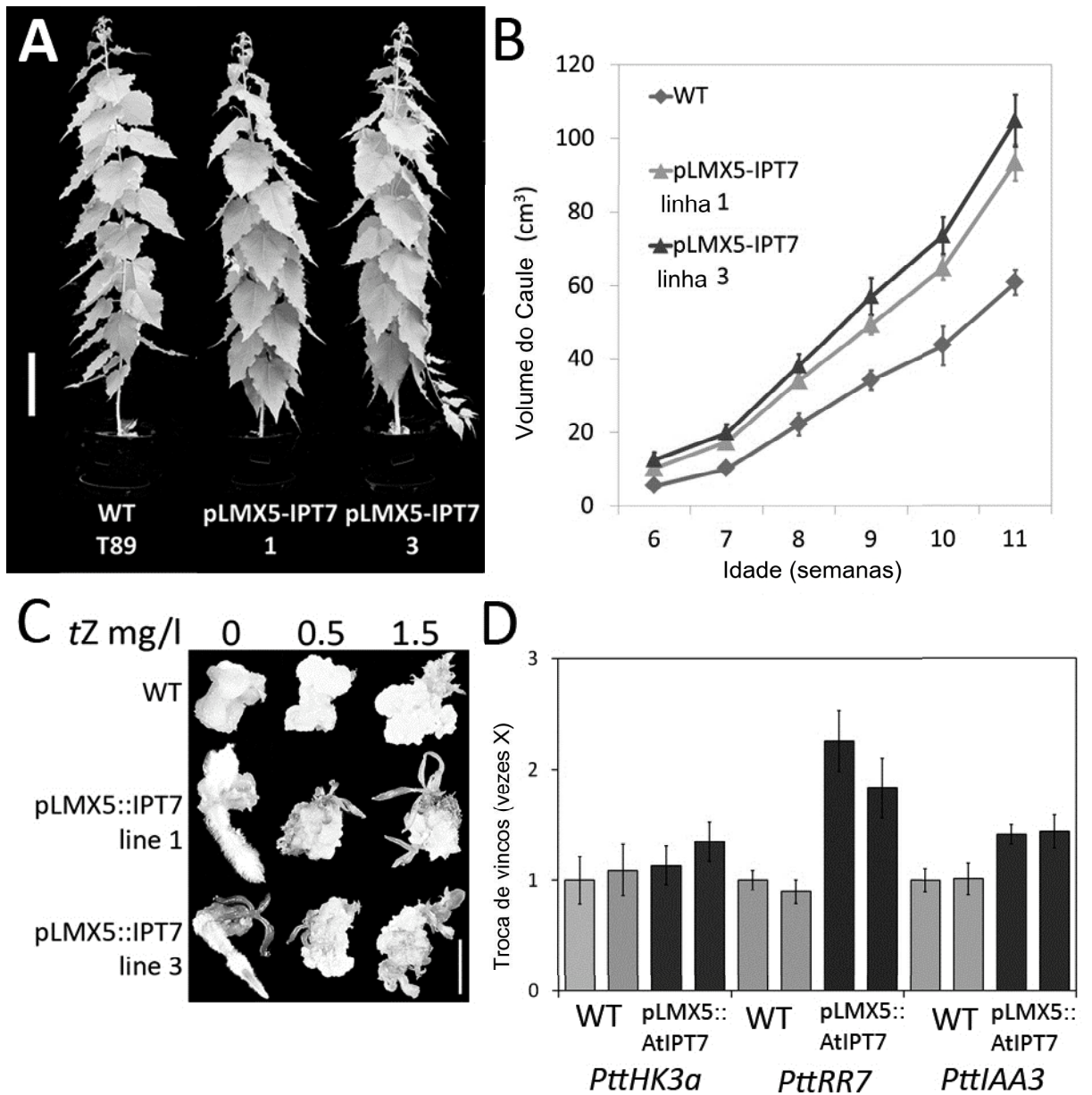


Fig. 3



Fig. 4



Figs. 5A - 5D

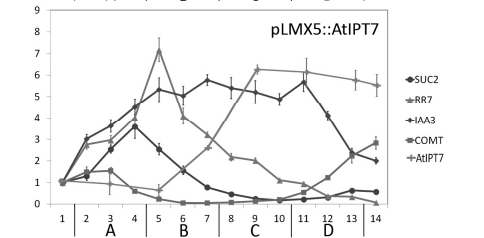
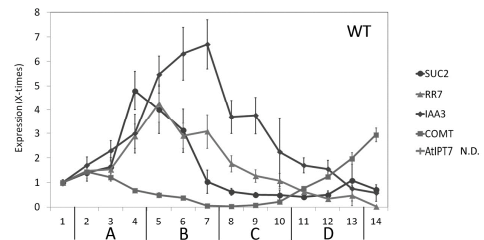
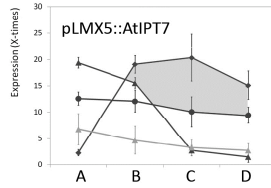
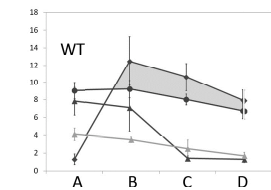
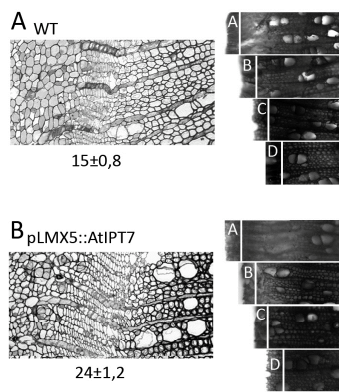


Fig. 6