

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

(21) **PI0615073-0 A2**

(22) Data de Depósito: 22/08/2006
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/88
C12N 15/82

(54) Título: **MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, PLANTA TRANSGÊNICA E MÉTODO DE AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO CALOR EM PLANTAS**

(30) Prioridade Unionista: 24/08/2005 US 60/711,449,
02/11/2005 US 60/733,110, 02/11/2005 US 60/733,110, 24/08/2005
US 60/711,449

(73) Titular(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

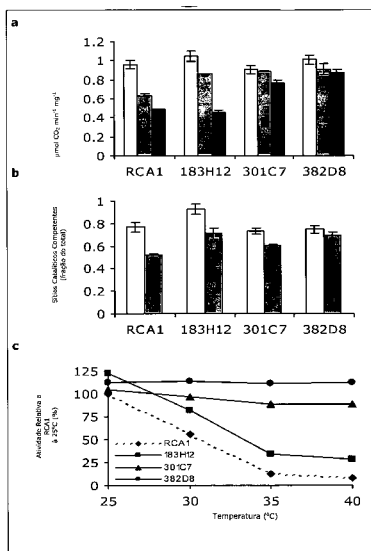
(72) Inventor(es): GENHAI ZHU, ITZHAK KUREK, LU LIU

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2006032797 de 22/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/024870 de 01/03/2007

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, PLANTA TRANSGÊNICA E MÉTODO DE AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO CALOR EM PLANTAS. A presente invenção provê polipeptídeos termoestáveis relacionados com os polipeptídeos de RuBisCO ativase de Arabidopsis. A presente invenção refere-se ainda a ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção. São também objetos da presente invenção os métodos de utilização dos polipeptídeos e ácidos nucleicos da invenção, para aumentar a resistência de plantas aos problemas causados pelo calor.



MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, PLANTA TRANSGÊNICA E MÉTODO DE AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO CALOR EM PLANTAS

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, em geral, a aumentar os níveis de fotossíntese em plantas cultivadas sob temperaturas aumentadas. Mais particularmente, a presente
10 invenção refere-se a melhorar a termoestabilidade da enzima fotossintética RuBisCo Ativase.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) é uma importante enzima no processo fotossintético. Essa enzima incorpora CO₂ em plantas durante a fotossíntese. O oxigênio atmosférico compete com CO₂ como um substrato para RuBisCo, dando início à
20 fotorrespiração e fazendo da Rubisco a etapa limitante na taxa de fotossíntese.

RuBisCo Ativase (RCA) é uma proteína que catalisa a ativação da Rubisco, que, por outro lado, regula a
25 fotossíntese iniciando a redução fotossintética de carbono e oxidação fotorrespiratória de carbono. A enzima RuBisCo Ativase catalisa a liberação de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) a partir da Rubisco. Esse sítio recém desocupado na Rubisco está agora livre para se ligar aos ativadores CO₂ e

Mg²⁺ para ocorrer fotossíntese. RuBisCo Ativase é também responsável por liberar inibidores de açúcar fosfato da Rubisco e restaura a atividade catalítica da Rubisco. Assim, se RuBisCo Ativase está danificada, Rubisco
5 permanece inativa e a fotossíntese se torna mais lenta.

A RuBisCo Ativase é termolábil e, assim, possui atividade decrescente com temperaturas aumentadas. Como resultado, o processo fotossintético se torna mais lento
10 devido à falta de ativação da Rubisco. A enzima RuBisCo Ativase se desnatura sob temperaturas aumentadas, deixando, assim, a enzima incapaz de converter Rubisco inativa para a forma ativa. *Arabidopsis* contém duas isoformas de RCA, uma forma curta termolábil (RCA1) e a longa, relativamente
15 termoestável (RCA2), que são geradas por *splicing* alternativo de pré-RNAm (Werneke, et al., 1989, *Plant Cell* 1:815-825).

Plantas de cultivo cultivadas em climas quentes
20 poderiam se beneficiar de níveis fotossintéticos elevados. Conseqüentemente, se a etapa limitante de taxa pudesse ser feita mais tolerante ao calor, as plantas de cultivo poderiam crescer mais facilmente nesses climas.

25 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a polipeptídeos derivados da RuBisCo Ativase que são mais termoestáveis do que a RuBisCo Ativase naturalmente ocorrente. Os

polipeptídeos derivados da RuBisCo Ativase da invenção substancialmente retêm a atividade em plantas cultivadas sob condições de temperatura aumentada. Moléculas de ácidos nucleicos codificando os polipeptídeos da invenção
5 são também englobadas.

Além dos polipeptídeos derivados da RuBisCo Ativase da invenção, será colocado que a invenção também engloba variantes desses, incluindo, mas não se limitando a,
10 qualquer seqüência substancialmente similar, qualquer fragmento de polipeptídeo, análogo, homólogo, mutante, ou modificado dessa. As variantes englobadas pela invenção são pelo menos parcialmente funcionalmente ativos (i.e., são capazes de apresentar uma ou mais atividades funcionais
15 conhecidas associadas com RuBisCo Ativase de tipo selvagem) sob condições aquecidas. Moléculas de ácidos nucleicos codificando os polipeptídeos variantes são também englobadas.

20 Vetores compreendendo um ou mais ácidos nucleicos da invenção são também englobados.

Células compreendendo um polipeptídeo, molécula de ácido nucleico, e/ou vetor da invenção são também
25 englobadas.

A presente invenção também está relacionada a plantas transgênicas compreendendo um polipeptídeo, molécula de ácido nucleico, e/ou vetor da invenção. As plantas

transgênicas podem expressar o transgene por qualquer meio conhecido na arte incluindo, mas não se limitando a, expressão constitutiva, expressão regulada por desenvolvimento, expressão tecido-específica, etc. Sementes
5 obtidas de uma planta transgênica da invenção são também englobadas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10 **FIGS. 1A-1C:** Caracterização de RCA do tipo selvagem (RCA1) e variantes termoestáveis (183H12, 301C7 e 382D8). **(A)** Atividade da RuBisCo após a ativação por ativase após tratamento a 25°C (branco), 40°C (cinza) e 45°C (preto). Proteínas ativase foram incubadas nas temperaturas
15 indicadas por 15 min antes do teste a 25°C. **(B)** Ativação da RuBisCo sob condições catalíticas a 25°C (branco) e 40°C (cinza). **(C)** Atividade ATPase de proteínas ativase incubadas nas temperaturas indicadas por 15 min. antes do teste a 25°C.

20

FIGS. 2A-2D: Caracterização do mutante de RuBisCo Ativase (Δrca) em CO₂ ambiente. **(A)** Análise de *imuno-blot* de folhas de plantas *Arabidopsis* do tipo selvagem (RCA/RCA), heterozigotas (RCA/ Δrca) e homozigotas ($\Delta rca/\Delta rca$). O blot
25 foi imunodecorado com anticorpos policlonais criados contra RCA1 recombinante de *Arabidopsis*. **(B)** Desempenho fotossintético de plantas de três semanas de idade de tipo selvagem (acima) e Δrca (abaixo) medido usando análise de fluorescência de imagem. **(C)** Área foliar das plantas

descritas em (B) (50 plantas por fenótipo) na idade indicada. **(D)** Fotografia de plantas de oito semanas de idade de tipo selvagem (acima) e Δrca (abaixo).

5 **FIGS. 3A-3C:** Caracterização molecular do mutante Δrca . **(A)** Mapa esquemático de alelos de tipo selvagem (RCA) e de deleção (Δrca). Os números indicam os éxons RCA. Os *primers forward* e reversos para amplificação dos produtos de PCR de 1,4kb PCR de alelos RCA (RCAf e RCAr) e Δrca (rcaf e rcar) são indicados. **(B)** Análise de PCR (*primers* RCA -painel superior; *primers* rca - painel inferior) de plantas T1 expressando 183H12. Número de linhagens (acima) e base genética (abaixo) são indicados. **(C)** Análise de *Western blot* de proteína total (5 μ g/faixa) de folhas das
10
15 linhagens descritas em (B). O *blot* foi sondado com anticorpos policlonais criados contra RCA1 recombinante.

FIGS. 4A-4D: Complementação funcional de mutantes Δrca expressando RCA1 e variantes termoestáveis 183H12, 301C7 e 382D8 sob condições normais de cultivo (22°C). Os números indicam as designações de linhagens de eventos de transformação independentes. **(A)** Análise de *Imuno-blot* de proteína total de folhas de três semanas de idade. **(B)** Fotografias representando o tamanho similar de todas as
20
25 plantas descritas acima quando cultivadas sob condições normais. **(C)** Desempenho fotossintético das plantas (plantas 8 a 10 / linhagem independente) descritas acima monitorada por análise de fluorescência de imagem. **(D)** Efeito de tratamento de estresse por calor moderado

temporário (1 hr) em taxas fotossintéticas de linhagens *Δrca* transgênicas expressando RCA1 e variantes termoestáveis. A fotossíntese líquida de quatro plantas independentes por linhagem foi monitorada usando um analisador de gás infravermelho a 22°C (branco) e 30°C (cinza).

FIGS. 5A-5F: Efeito de estresse de calor moderado (30°C por 4 hr por dia) em plantas do tipo selvagem e mutantes *Δrca* expressando RCA1 ou variantes termoestáveis 183H12, 301C7 e 382D8. **(A)** Fotografia das plantas apresentando taxas de crescimento diferencial mediadas por variante RCA. **(B)** Área foliar de 8-10 plantas independentes por linhagem, analisadas usando um sistema de análise de fluorescência de imagem. Médias seguidas por letras comuns não são significativamente diferentes a $P=0,05$ usando um LSD protegido. **(C)** Fotossíntese líquida de quatro plantas independentes de linhagens selecionadas, monitorada por análise de troca gasosa após 2hr a 30°C. **(D)** Fotografia de plantas maduras (8-semanas de idade) descrita em (C). **(E)** Número de siliquas por planta. Oito a dez plantas independentes por linhagem foram analisadas. **(F)** Peso de Semente/1000 sementes de sementes colhidas das linhagens selecionadas (5 plantas independentes por linhagem).

25

FIGS. 6A-6D: Efeito de estresse por calor de 26°C no desenvolvimento e rendimento de plantas de tipo selvagem e linhagens mutantes *Δrca* expressando RCA1 e variante termoestável 183H12. **(A)** Número de siliquas por planta.

Dez a doze plantas independentes por linhagem foram analisadas. **(B)** Fotografia de síliquas das linhagens selecionadas cultivadas na temperatura indicada apresentando variação em tamanho de síliqua e disposição de sementes. Barra = 0,5 cm **(C)** Peso de semente /1000 sementes para sementes colhidas a partir das plantas descritas em (A). **(D)** Taxas de germinação (a 22°C) de sementes (250 sementes por linhagem) colhidas de plantas de *Arabidopsis* que foram cultivadas a 22°C (em branco) ou 26°C (cinza).

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção provê polipeptídeos derivados da RuBisCo Ativase. Moléculas de ácidos nucleicos codificando os polipeptídeos da invenção são também providas. Métodos para usar os polipeptídeos e ácidos nucleicos da invenção para aumentar a tolerância de plantas ao calor, compreendendo intensificar a termoestabilidade de RuBisCo Ativase são englobados.

Polipeptídeos da invenção

A presente invenção é relacionada à polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase que são mais termoestáveis do que a RuBisCo Ativase naturalmente ocorrente. Em avanços preferidos, o polipeptídeo derivado da Rubisco Ativase é qualquer das SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22. Polipeptídeos da invenção também englobam aqueles

polipeptídeos que são codificados por qualquer ácido nucléico derivado de RuBisCo Ativase da invenção.

Além dos polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase da
5 invenção, será colocado que invenção também engloba
variantes desses, incluindo, mas não se limitando a,
qualquer seqüência substancialmente similar, qualquer
polipeptídeo de fusão, qualquer fragmento, análogo,
homólogo, mutante, ou polipeptídeo modificado desses. As
10 variantes englobadas pela invenção são ao menos
parcialmente funcionalmente ativas (i.e., são capazes de
apresentar uma ou mais atividades funcionais associadas com
RuBisCo Ativase de tipo selvagem) sob condições aquecidas.
Tais atividades funcionais incluem, mas não são limitadas
15 a, atividades biológicas, tais como ativação de Rubisco;
antigenicidade, i.e., uma habilidade de se ligar ou
competir com RuBisCo Ativase de tipo selvagem (incluindo,
mas não se limitando a, SEQ ID NO: 2) para se ligar a um
anticorpo anti-RuBisCo Ativase; imunogenicidade, i.e., uma
20 habilidade de gerar anticorpo que se liga a um polipeptídeo
de RuBisCo Ativase de tipo selvagem. Em avanços
preferidos, as variantes possuem ao menos uma atividade
funcional que é substancialmente similar a, ou melhor do
que seu polipeptídeo parental (i.e., o polipeptídeo
25 derivado de rubisco ativase inalterado). Como aqui usado,
a atividade funcional da variante será considerada
"substancialmente similar" ao seu polipeptídeo parental se
estiver dentro do desvio padrão do mesmo.

Em um avanço, polipeptídeos que possuem ao menos uma atividade funcional de RuBisCo Ativase (e.g., ativação de Rubisco) sob condições aquecidas e são ao menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticos à sequência de polipeptídeos de qualquer de SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 são englobados pela invenção. Em avanços específicos, tais polipeptídeos da invenção são alterados em um ou mais, dois ou mais, cinco ou mais, ou sete ou mais posições correspondentes aos resíduos 42, 130, 131, 168, 257, 274, 293 e 310 de SEQ ID NO: 2 com alinhamento ótimo da sequência de polipeptídeos com SEQ ID NO: 2. Com respeito a uma sequência de aminoácidos que é alinhada de forma ótima com uma sequência referência, um aminoácido "corresponde" à posição na sequência referência com a qual o resíduo é pareado no alinhamento.

Como aqui usado, onde uma sequência é definida como sendo "ao menos X% idêntica" a uma sequência referência, e.g., "um polipeptídeo ao menos 95% idêntico a SEQ ID NO: 4", será entendido que "X% idêntico" refere-se à identidade percentual absoluta, a menos que indicado ao contrário. O termo "identidade percentual absoluta" refere-se a uma porcentagem de identidade de sequência determinada pontuando-se aminoácidos ou ácidos nucleicos idênticos como um e qualquer substituição como zero, independente da similaridade de aminoácidos ou ácidos nucleicos sem correspondência. Em um alinhamento de sequências típico, a "identidade percentual absoluta" de duas sequências é apresentada como uma porcentagem de "identidades" de

aminoácidos ou ácidos nucléicos. Em casos onde um alinhamento ótimo de duas seqüências requer a inserção de um espaço em uma ou ambas seqüências, um resíduo de aminoácido em uma seqüência que se alinha com um espaço na
5 outra seqüência é contado como uma falta de correspondência para propósitos de determinar a identidade percentual. Espaços podem ser internos ou externos, i.e., uma truncação. A identidade percentual absoluta pode ser prontamente determinada usando, por exemplo, o programa
10 Clustal W, version 1.8, June 1999, usando parâmetros padrão (Thompson et al., 1994, *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680).

Em outro avanço, polipeptídeos de fusão compreendendo
15 um polipeptídeo derivado de rubisco ativase ou variante desses são englobados pela invenção. Em um avanço específico, um peptídeo (tais como aqueles descritos em U.S. Patent Application Serial No. 11/150,054) é adicionado em um polipeptídeo da invenção, através do qual o peptídeo
20 direciona a localização do polipeptídeo anexado aos plastídios vegetais ou aos órgãos fotossintéticos da planta.

Em outro avanço, fragmentos de polipeptídeos derivados
25 de RuBisCo Ativase são englobados pela invenção. Polipeptídeos são englobados tendo ao menos uma atividade funcional (e.g., ativação de Rubisco) de RuBisCo Ativase sob condições aquecidas e são de, ao menos, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375

ou 380 aminoácidos contíguos em comprimento de qualquer de SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22. Em avanços preferidos, o polinucleotídeo, que codifica o polipeptídeo fragmento, hibridiza sob condições rigorosas
5 ao ácido nucléico que codifica qualquer de SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, e 22.

Em um avanço específico, um fragmento da invenção corresponde a um domínio funcional de RuBisCo Ativase
10 incluindo, mas não se limitando a, o domínio de ligação de ATP e o domínio de interação com substrato (ver, e.g., Li, et al. (2005) *J Biol Chem* 280:24864-24869; Salvucci, et al., (1994) *Biochemistry* 33:14879-14886; e van de Loo, et al., (1996) *Biochemistry* 35:8143-8148).

15

Em outro avanço, polipeptídeos análogos são englobados pela invenção. Polipeptídeos análogos podem possuir resíduos que foram modificados, i.e., pela anexação covalente de qualquer tipo de molécula aos polipeptídeos
20 derivados de RuBisCo Ativase. Por exemplo, mas não por meio de limitação, um polipeptídeo análogo da invenção pode ser modificado, e.g., por glicosilação, acetilação, conjugação a polietileno glicol, fosforilação, amidação, derivação por grupos protetores/bloqueadores conhecidos,
25 clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Um polipeptídeo análogo da invenção pode ser modificado por modificações químicas usando técnicas conhecidas daqueles especialistas na arte, incluindo, mas não se limitando a clivagem química

específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, um análogo de um polipeptídeo da invenção pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

5

Em outro avanço da invenção, um polipeptídeo derivado de rubisco ativase não é SEQ ID NO: 2. Ainda em outro avanço da invenção, um polipeptídeo derivado de rubisco ativase não é um polipeptídeo de tipo selvagem naturalmente

10

ocorrente.

Métodos de produção dos polipeptídeos da invenção, e.g., por meios recombinantes, são também providos.

15 Moléculas de ácidos nucleicos da invenção

A presente invenção também está relacionada com as moléculas de ácidos nucleicos codificando polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase. Em avanços preferidos, a

molécula de ácido nucleico derivada de RuBisCo Ativase é qualquer de SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21. Moléculas de ácidos nucleicos da invenção também englobam aquelas moléculas de ácidos nucleicos que codificam quaisquer polipeptídeos derivados de RuBisCo

Ativase da invenção.

20

25

Além das moléculas de ácidos nucleicos codificando polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase, será colocado que moléculas de ácidos nucleicos da invenção também

englobam aqueles polipeptídeos codificadores que são variantes de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase, incluindo, mas não se limitando a, qualquer sequência substancialmente similar, qualquer polipeptídeo de fusão, qualquer fragmento, análogo, homólogo, mutante, ou polipeptídeo modificado desse. As variantes de molécula de ácido nucléico englobadas pela invenção codificam polipeptídeos que são ao menos parcialmente funcionalmente ativos (i.e., são capazes de apresentar uma ou mais atividades funcionais conhecidas associadas com RuBisCo Ativase de tipo selvagem) sob condições aquecidas.

Em um avanço, moléculas de ácidos nucléicos que são ao menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticas a qualquer das moléculas de ácidos nucléicos de SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 são englobadas pela invenção. Em avanços específicos, tais moléculas de ácidos nucléicos da invenção codificam polipeptídeos que são alterados em um ou mais, dois ou mais, cinco ou mais, ou sete ou mais posições correspondentes aos resíduos 42, 130, 131, 168, 257, 274, 293 e 310 de SEQ ID NO: 2 com alinhamento ótimo da sequência de nucleotídeos com SEQ ID NO: 2.

Para determinar a identidade percentual de duas moléculas de ácidos nucléicos, as sequências são alinhadas para propósitos de comparação ótima (e.g., espaços podem ser introduzidos na sequência de uma primeira molécula de ácido nucléico para alinhamento ótimo com uma segunda ou

molécula de ácido nucléico). Os nucleotídeos nas posições de nucleotídeo correspondentes são, então, comparados. Quando uma posição na primeira seqüência é ocupada pelo mesmo nucleotídeo da posição correspondente na segunda seqüência, então, as moléculas são idênticas naquela posição. A identidade percentual entre duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (i.e., % identidade = número de posições idênticas se sobrepondo / número total de posições x 100%).

10 Em um avanço, as duas seqüências são do mesmo tamanho.

A determinação da identidade percentual entre duas seqüências pode ser também conseguida usando um algoritmo matemático. Um exemplo não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas seqüências é o algoritmo de Karlin and Altschul (Karlin and Altschul, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2264-2268, modificado como em Karlin and Altschul, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877). Tal algoritmo é incorporado nos programas

20 NBLAST e XBLAST (Altschul, et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 e Altschul, et al., (1997) *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402). O software para efetuar análises BLAST está publicamente disponível, e.g., através do National Center for Biotechnology Information. Esse algoritmo envolve,

25 primeiro, identificar pares de seqüência de alta pontuação (HSPs) identificando palavras curtas de comprimento W na seqüência pesquisada, o que tanto corresponde ou satisfaz alguma pontuação T limite positiva valorada quando alinhada com uma palavra do mesmo comprimento em uma seqüência da

base de dados. T é referido como o limite de pontuação de palavra de vizinhança (Altschul, *et al.*, *supra*). Essa palavra de vizinhança inicial serve como ponto de partida para iniciar buscas para encontrar HSPs mais longas contendo-as. As correspondências entre palavras são, então, estendidas em ambas as direções para cada sequência para o máximo que a pontuação de alinhamento cumulativo puder ser aumentada. Pontuações cumulativas são calculadas usando, para seqüências de nucleotídeos, os parâmetros M (pontuação de recompensa para um par de resíduos com correspondência; sempre > 0) e N (pontuação de penalidade para resíduos sem correspondência; sempre < 0). Para polipeptídeos, uma matriz de pontuação é usada para calcular a pontuação cumulativa. A extensão de correspondências de palavra em cada direção é parada quando: a pontuação cumulativa de alinhamento cai pela quantidade X a partir de ser máximo valor alcançado; a pontuação cumulativa vai para zero ou abaixo, devido à acumulação de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontuação negativa; ou a extremidade de qualquer das seqüências é alcançada. Os parâmetros do algoritmo BLAST W, T, e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para seqüências de nucleotídeos) usa como padrões, um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um corte de 100, M = 5, N = -4, e uma comparação de ambas as fitas. Para polipeptídeos, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10,

e a matriz de pontuação BLOSUM62 (ver, Henikoff & Henikoff, (1989) *PNAS* 89:10915).

O método de alinhamento Clustal V pode ser também
5 usado para determinar a identidade percentual (Higgins and Sharp, (1989) *CABIOS* 5:151-153) e é encontrado no programa Megalign da suíte computacional *LASERGENE bioinformatics computing suite* (DNASTAR Inc., Madison, WI). Os
10 "parâmetros padrão" são os parâmetros pré-estabelecidos pelo fabricante do programa e para múltiplos alinhamentos eles correspondem a PENALIDADE de espaço (GAP)=10 e PENALIDADE DE COMPRIMENTO DE ESPAÇO (GAP LENGTH)=10, enquanto que para alinhamentos par a par, eles são KTUPLE 1, PENALIDADE DE ESPAÇO (GAP)=3, JANELA=5 E DIAGONAIS
15 GRAVADAS=5. Após o alinhamento das seqüências, usando o programa Clustal V, é possível obter uma "identidade percentual" visualizando a tabela de "distâncias de seqüência" no mesmo programa.

20 A identidade percentual entre duas seqüências pode ser determinada usando técnicas similares àquelas descritas acima, com ou sem espaços permitidos. No cálculo da identidade percentual, tipicamente apenas correspondências exatas são contadas.

25

Em outro avanço, fragmentos de moléculas de ácidos nucléicos derivadas de RuBisCo Ativase são englobados pela invenção. São englobadas moléculas de ácidos nucléicos que possuem ao menos uma atividade funcional de RuBisCo Ativase

(e.g., ativação de Rubisco) sob condições aquecidas e são de ao menos 100, 250, 500, 750, 950, 1000 ou 1100 nucleotídeos contíguos em comprimento de qualquer de SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21.

5

Em um avanço específico, um fragmento da invenção corresponde a uma molécula de ácido nucléico que codifica um domínio funcional de RuBisCo Ativase incluindo, mas não se limitando a, o domínio de ligação de ATP e o domínio de interação de substrato (ver, e.g., Li, et al., (2005) *J Biol Chem* 280:24864-24869; Salvucci, et al., (1994) *Biochemistry* 33:14879-14886; e van de Loo, et al., (1996) *Biochemistry* 35:8143-8148).

10

15

Em outro avanço, uma molécula de ácido nucléico que hibridiza sob condições rigorosas a qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 é englobada pela invenção. A expressão "condições rigorosas" refere-se a condições de hibridização sob as quais um ácido nucléico hibridizará ao seu ácido nucléico alvo, tipicamente em uma mistura complexa de ácido nucléico, mas para essencialmente nenhum outro ácido nucléico. Condições rigorosas são dependentes de sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Ácidos nucléicos mais longos hibridizam especificamente em maiores temperaturas. Guias extensivos para a hibridização de ácidos nucléicos podem ser encontrados na arte (e.g., Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization

20

25

and the strategy of nucleic acid assays" (1993)). Geralmente, condições altamente rigorosas são selecionadas para serem cerca de 5-10°C menores que o ponto térmico de fusão (T_m) para o ácido nucléico específico em uma força iônica e pH definidos. Condições de baixo rigor são geralmente selecionadas para estarem cerca de 15-30°C abaixo da T_m . A T_m é a temperatura (sob força iônica, pH e concentração de ácido nucléico definidos) na qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam ao ácido nucléico

10 alvo em equilíbrio (como os ácidos nucléicos alvo são presentes em excesso, na T_m , 50% das sondas são ocupadas no equilíbrio). Condições de hibridização são tipicamente aquelas nas quais a concentração de sais é menor do que cerca de 1,0 M de íons de sódio, tipicamente cerca de 0,01

15 a 1,0 M de concentração de íons de sódio (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é ao menos cerca de 30°C para sondas curtas (e.g., 10 a 50 nucleotídeos) e ao menos cerca de 60°C para sondas longas (e.g., maiores do que 50 nucleotídeos). Condições rigorosas podem ser também

20 alcançadas com a adição de agentes desestabilizantes, tais como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo é ao menos duas vezes a base, e preferivelmente 10 vezes a hibridização base. A expressão "hibridiza especificamente" refere-se à ligação,

25 duplicação, ou hibridização de uma molécula apenas para uma sequência de nucleotídeos em particular sob condições de hibridização rigorosas quando aquela sequência está presente em uma mistura complexa (e.g., total celular ou DNA ou RNA de biblioteca).

Em outro avanço da invenção, uma molécula de ácido nucléico derivada de RuBisCo Ativase não é SEQ ID NO: 1. Ainda em outro avanço da invenção, uma molécula de ácido nucléico derivada RuBisCo Ativase não é uma molécula de ácido nucléico de tipo selvagem naturalmente ocorrente.

Vetores compreendendo moléculas de ácidos nucléicos da invenção são também englobados. Células ou plantas compreendendo os vetores da invenção são também englobadas.

O termo "molécula de ácido nucléico" refere-se aqui a um polímero de fita simples ou dupla de bases de desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo lido da extremidade 5' para a extremidade 3'. Isto inclui DNA cromossômico, plasmídeo auto-replicantes e DNA ou RNA que efetua um papel primariamente estrutural.

Seqüências derivadas da RuBisCo Ativase

Polipeptídeos e moléculas de ácidos nucléicos derivados de RuBisCo Ativase da invenção podem ser criados introduzindo-se uma ou mais substituições, adições e/ou deleções de resíduos em uma RuBisCo Ativase de tipo selvagem (wt) (incluindo, mas não se limitando a, RuBisCo Ativase de *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 2)). Geralmente, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase são criados para acentuar uma característica desejável ou reduzir uma característica indesejável de um polipeptídeo de RuBisCo

Ativase de tipo selvagem. Em um avanço, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase melhoraram a termoestabilidade sobre RuBisCo Ativase de tipo selvagem. Em outro avanço, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase possuem
5 atividade enzimática sob condições aquecidas (e.g., 40°C) que é similar a ou maior que a atividade da enzima de RuBisCo Ativase de tipo selvagem sob condições normais (e.g., 25°C).

10 Em um avanço, uma molécula de ácido nucléico de RuBisCo Ativase de tipo selvagem (e.g., SEQ ID NO: 1) é usada como um modelo para criar moléculas de ácidos nucléicos derivadas de RuBisCo Ativase. Em alguns avanços, resíduos de ácidos nucléicos que codificam um ou mais
15 resíduos de aminoácido, correspondendo aos resíduos 42, 130, 131, 168, 257, 274, 293 e 310 de SEQ ID NO: 2, com alinhamento ótimo da seqüência de nucleotídeos com SEQ ID NO: 2, são alterados de forma que o aminoácido codificado é alterado.

20

Alterações de seqüência podem ser introduzidas por técnicas padrão, tais como técnicas de evolução molecular direcionada e.g., métodos de embaralhamento de DNA (ver, e.g., Christians, et al., (1999) *Nature Biotechnology*
25 17:259-264; Cramer, et al., (1998) *Nature* 391:288-291; Cramer, et al., (1997) *Nature Biotechnology* 15:436-438; Cramer, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:315-319; Stemmer, (1994) *Nature* 370:389-391; Stemmer, et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10747-10751; United States Patent

Nos. 5.605.793; 6.117.679; 6.132.970; 5.939.250; 5.965.408; 6.171.820; International Publication Nos. WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; e WO 01/75767); mutagênese sítio direcionada (ver, e.g., Kunkel, 5 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:488-492; Oliphant, et al., (1986) *Gene* 44:177-183); mutagênese oligonucleotídeo-direcionada (ver, e.g., Reidhaar-Olson, et al., (1988) *Science* 241:53-57); mutagênese química (ver, e.g., Eckert, et al., (1987) *Mutat. Res.* 178:1-10); error prone PCR (ver, 10 e.g., Caldwell & Joyce, (1992) *PCR Methods Applic.* 2:28-33); e mutagênese de cassete (ver, e.g., Arkin, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:7871-7815); (ver geralmente, e.g., Arnold, (1993) *Curr. Opinion Biotechnol.* 4:450-455; Ling, et al., (1997) *Anal. Biochem.*, 254(2):157-15 78; Dale, et al., (1996) *Methods Mol. Biol.* 57:369-74; Smith, (1985) *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein, et al., (1985) *Science*, 229:1193-1201; Carter, (1986) *Biochem. J.* 237:1-7; Kramer, et al., (1984) *Cell* 38:879-887; Wells, et al., (1985) *Gene* 34:315-323; Minshull, et al., (1999) 20 *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290).

Em um avanço, embaralhamento de DNA é usado para criar moléculas de ácidos nucleicos derivadas de RuBisCo Ativase. Embaralhamento de DNA pode ser conseguido *in vitro*, *in* 25 *vivo*, *in silico*, ou através de uma combinação desses. Métodos *in silico* de recombinação podem ser efetuados nos quais algoritmos genéticos são usados em um computador para recombinar trechos de sequência que correspondem a ácidos nucleicos homólogos (ou mesmo não homólogos). Os trechos

de sequência recombinados resultantes são opcionalmente convertidos em ácidos nucleicos pela síntese de ácidos nucleicos que correspondem às sequências recombinadas, e.g., em harmonia com técnicas de reunião de gene com síntese de oligonucleotídeo. Essa abordagem pode gerar alterações randômicas, parcialmente randômicas ou projetadas. Vários detalhes em relação à recombinação *in silico*, incluindo o uso de algoritmos genéticos, operadores genéticos e similares em sistemas de computador, combinados com a geração de ácidos nucleicos correspondentes, assim como combinações de ácidos nucleicos projetados (e.g., baseado em seleção de sítio de *cross-over*) assim como projetadas, métodos de recombinação pseudo-randômicos ou randômicos, são descritos na arte (ver, e.g., International Publication Nos. WO 00/42560 e WO 00/42559).

Em outro avanço, mutagênese direcionada é usada para criar moléculas de ácidos nucleicos derivadas de RuBisCo Ativase escolhendo sequências de nucleotídeos ou posições da RuBisCo Ativase de tipo selvagem em particular para alteração. Tais mutações direcionadas podem ser introduzidas em qualquer posição no ácido nucleico e podem ser conservadas ou não conservadas.

Uma "substituição de aminoácido não conservada" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral diferente. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na arte. Essas famílias incluem

aminoácidos com cadeias laterais básicas (e.g., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (e.g., ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina), cadeias laterais polares não carregadas (e.g., glicina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (e.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais β -ramificadas (e.g., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e.g., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

Alternativamente ou adicionalmente a substituições de resíduos de aminoácido não conservadas, tais mutações podem ser conservadas. Uma "substituição de aminoácido conservada" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Após a mutagênese, a proteína codificada pode ser expressa de forma recombinante e a atividade da proteína pode ser determinada.

20

Em alguns avanços, substituições podem ser feitas de forma que o aminoácido, na posição 42, possua uma cadeia lateral polar não carregada ou uma cadeia lateral β -ramificada, na posição 130, possua uma cadeia lateral básica, na posição 131, possua uma cadeia lateral apolar ou uma cadeia lateral β -ramificada, na posição 168, possua uma cadeia lateral básica, na posição 257, possua uma cadeia lateral apolar ou uma cadeia lateral β -ramificada, na posição 274, possua uma cadeia lateral básica, na posição

293, possua uma cadeia lateral básica, e/ou na posição 310, possua uma cadeia lateral ácida. As posições de aminoácidos podem ser determinadas alinhando otimamente as seqüências de aminoácidos do polipeptídeo derivado de rubisco ativase codificado com SEQ ID NO: 2.

Em outro avanço, mutagênese aleatória é usada para criar moléculas de ácidos nucléicos derivadas de RuBisCo Ativase. Mutações podem ser introduzidas randomicamente ao longo de toda ou parte da seqüência codificadora (e.g., por mutagênese de saturação). Em certos avanços, seqüências de nucleotídeos codificando outros polipeptídeos relacionados que possuem domínios similares, motivos estruturais, sítios ativos, ou que se alinham com uma porção de RuBisCo Ativase de tipo selvagem com faltas de correspondência ou correspondências imperfeitas, podem ser usadas no processo de mutagênese para gerar diversidade de seqüências.

Deveria ser entendido que, para cada etapa de mutagênese em algumas das técnicas acima mencionadas, um número de ciclos interativos de quaisquer ou de todas as etapas, podem ser efetuados para otimizar a diversidade de seqüências. Os métodos acima descritos podem ser usados em combinação em qualquer ordem desejada. Em várias instâncias, os métodos resultam em um *pool* de seqüências de ácidos nucléicos alteradas ou um *pool* de células hospedeiras recombinantes compreendendo seqüências de ácidos nucléicos alteradas. As seqüências de ácidos nucléicos ou células hospedeiras alteradas, expressando uma

seqüência de ácidos nucléicos alterada com as características desejadas, podem ser identificadas por rastreamento com um ou mais testes conhecidos na arte. Os testes podem ser conduzidos sob condições que selecionam polipeptídeos possuindo as características físicas ou químicas desejadas. As alterações na seqüência de ácidos nucléicos podem ser determinadas seqüenciando-se a molécula de ácido nucléico codificando o polipeptídeo alterado nos clones.

10

Adicionalmente, moléculas de ácidos nucléicos derivadas de RuBisCo Ativase podem ser códon otimizadas, tanto completamente ou em parte. Como qualquer aminoácido (exceto metionina) é codificado por um número de códons (Tabela 1), a seqüência da molécula de ácido nucléico pode ser modificada sem mudar o aminoácido codificado. Otimização de códon é quando um ou mais códons são alterados no nível de ácido nucléico para coincidir com ou se aproximar melhor do uso de códon de um hospedeiro em particular. A freqüência de uso de códon preferida exibida por uma célula hospedeira pode ser calculada fazendo a média da freqüência de uso de códon preferido em um número grande de genes expressos pela célula hospedeira. Essa análise pode ser limitada a genes que são altamente expressos pela célula hospedeira. U.S. Patent No. 5.824.864, por exemplo, provê a freqüência de uso de códon por genes altamente expressos exibida por plantas dicotiledôneas e plantas monocotiledôneas. Aqueles de conhecimento ordinário na arte reconhecerão que estão

25

disponíveis na arte tabelas e outras referências provendo informações de preferência para uma ampla gama de organismos.

5 Métodos de ensaio de atividade da RuBisCo Ativase

A presente invenção é direcionada para polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase com termoestabilidade melhorada, se comparados a RuBisCo Ativase de tipo selvagem. Como aqui usado, o termo "termoestabilidade melhorada" refere-se à habilidade aumentada de RuBisCo Ativase ativar a Rubisco sob condições aquecidas, se comparado com RuBisCo Ativase do tipo selvagem. Em um avanço, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase têm atividade enzimática sob condições aquecidas (e.g., 35°C ou mais) que é maior que a atividade enzimática de RuBisCo Ativase de tipo selvagem sob condições aquecidas. Em outro avanço, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase têm atividade enzimática sob condições aquecidas (e.g., 26°C ou mais, mais preferivelmente 40°C para testes *in vitro*) que é substancialmente similar a ou maior do que a atividade de enzima de RuBisCo Ativase de tipo selvagem sob condições normais (e.g., 20-25°C, mais preferivelmente 25°C para testes *in vitro* e 22°C para testes *in vivo*). Como aqui usado, o termo "substancialmente similar" refere-se à atividade enzimática de um polipeptídeo derivado de rubisco ativase que está dentro de um desvio padrão daquela de Rubisco de tipo selvagem.

Qualquer método conhecido na arte pode ser usado para testar a atividade de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase (incluindo, mas não se limitando a, ativação de Rubisco e hidrólise de ATP) sob condições aquecidas.

5

Em alguns avanços, a atividade do polipeptídeo derivado de rubisco ativase é testada *in vitro*. Em um avanço, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase podem ser testados para sua habilidade de ativar a Rubisco quando incubados em solução compreendendo Rubisco desativada, RuBP, ATP, e uma fonte de carbono marcado (e.g., $[C^{14}]NaHCO_3$). A incorporação de carbono marcado em ácido 3-fosfoglicérico (GPA) pode ser monitorada como uma indicação de ativação de Rubisco. Em outro avanço, polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase podem ser testados para sua habilidade de hidrolisar ATP quando incubados em uma solução compreendendo ATP. Os testes podem ser conduzidos sob condições aquecidas ou sob condições normais, após os polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase serem aquecidos antes da realização do teste. Componentes purificados podem ser usados, assim como células compreendendo os componentes para ativação de Rubisco.

Em outros avanços, a atividade de polipeptídeo derivado de rubisco ativase é testada *in vivo*. Plantas que não expressam RuBisCo Ativase de tipo selvagem (e.g., mutantes de deleção) são feitas para expressar um ou mais polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase e podem ser analisadas para taxas de fotossíntese, biomassa, taxas de

crescimento, e produção de sementes sob condições aquecidas de cultivo. As plantas podem ser cultivadas totalmente sob condições aquecidas ou por períodos de tempo mais curtos sob condições aquecidas. Em um avanço, taxas de fotossíntese são medidas analisando as plantas para fixação de CO₂. Em outro avanço, taxas de crescimento são medidas analisando a área foliar das plantas. Em outro avanço, a produção de sementes é analisada determinando-se o peso de sementes de plantas maduras secas. Em outro avanço, a produção de sementes é analisada determinando-se a taxa de germinação de semente.

Métodos de intensificar a tolerância ao calor em Plantas

RuBisCo Ativase ativa Rubisco em plantas. A Rubisco ativada está envolvida na fotossíntese e é a etapa limitante de taxa do processo fotossintético. Com a atividade de RuBisCo Ativase diminuída, a Rubisco permanece inativa e a fotossíntese se torna mais lenta ou para. Temperaturas aumentadas desestabilizam e/ou desnaturam a RuBisCo Ativase, deixando, dessa forma, a enzima menos capaz ou incapaz de converter Rubisco inativa para a forma ativa. A presente invenção é direcionada para polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase com termoestabilidade melhorada, se comparados com RuBisCo Ativase de tipo selvagem. Sendo assim, o processo fotossintético pode se tornar mais tolerante ao calor com o envolvimento de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase com termoestabilidade melhorada.

Qualquer método conhecido na arte pode ser usado para fazer plantas expressarem um ou mais dos polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase da invenção. Em um avanço, plantas transgênicas podem ser feitas para expressar um ou mais polipeptídeos da invenção. A planta transgênica pode expressar um ou mais polipeptídeos da invenção em todos os tecidos (e.g., expressão global). Alternativamente, um ou mais polipeptídeos da invenção podem ser expressos apenas em um subgrupo de tecidos (e.g., expressão específica de tecido), preferencialmente aqueles tecidos ou organelas envolvidas na fotossíntese (e.g., os plastídios). Polipeptídeos da invenção podem ser expressos constitutivamente na planta ou estar sob o controle de um promotor induzido. Em alguns avanços, a expressão e/ou atividade da RuBisCo Ativase endógena da planta é reduzida ou eliminada.

Expressão Recombinante

Moléculas de ácidos nucleicos e polipeptídeos da invenção podem ser expressos de forma recombinante usando DNA recombinante padrão e técnicas de clonagem molecular que são bem conhecidas na arte (e.g., Sambrook, Fritsch, and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989)). Adicionalmente, técnicas de DNA recombinante podem ser usadas para criar construções de ácidos nucleicos adequados para uso na produção de plantas transgênicas.

Conseqüentemente, um aspecto da invenção pertence a vetores, preferencialmente vetores de expressão, compreendendo uma molécula de ácido nucléico da invenção, ou uma variante desses. Como aqui usado, o termo "vetor" refere-se a um polinucleotídeo capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual foi ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a um *loop* de DNA de dupla-fita circular no qual segmentos de DNA adicionais podem ser introduzidos. Outro tipo de vetor é um vetor viral, caracterizado pelo fato de que segmentos de DNA adicionais podem ser introduzidos no genoma viral.

Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (e.g., vetores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vetores epissomais). Outros vetores (e.g., vetores não epissomais) são integrados no genoma de uma célula hospedeira com a introdução na célula hospedeira, e, dessa forma, são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão freqüentemente na forma de plasmídios (vetores). Contudo, a invenção deve incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (e.g., retrovírus de replicação defeituosa).

Os vetores de expressão recombinantes da invenção compreendem uma molécula de ácido nucléico da invenção em uma forma adequada para expressão da molécula de ácido

nucléico e uma célula hospedeira. Isso significa que os vetores de expressão recombinantes incluem uma ou mais seqüências reguladoras, selecionadas com base nas células hospedeiras a serem usadas para expressão, que são

5 operacionalmente associadas com o polinucleotídeo a ser expresso. Em um vetor de expressão recombinante, "operacionalmente associado" deve significar que a seqüência de nucleotídeos de interesse está ligada à(s) seqüência(s) reguladora(s) de uma maneira que permite a

10 expressão da seqüência de nucleotídeos (e.g., em um sistema de transcrição/tradução *in vitro* ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "seqüência reguladora" deve incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle

15 de expressão (e.g., sinais de poliadenilação). Tais seqüências reguladoras estão descritas na arte (e.g., Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, (1990) Academic Press, San Diego, CA). Seqüências reguladoras incluem aquelas que direcionam a expressão

20 constitutiva de uma seqüência de nucleotídeos em vários tipos de células hospedeiras e aquelas que direcionam a expressão da seqüência de nucleotídeos apenas em certas células hospedeiras (e.g., seqüências reguladoras específicas de tecido). Será ponderado por aqueles

25 especialistas na arte que o projeto do vetor de expressão pode depender de tais fatores, como, a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, a área do organismo no qual a expressão é desejada, etc. Os vetores de expressão da invenção podem

ser introduzidos em células hospedeiras para, dessa forma, produzir proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas ou peptídeos de fusão, codificados por moléculas de ácidos nucleicos como aqui descrito.

5

Em alguns avanços, ácidos nucleicos isolados, que servem como elementos promotores ou intensificadores, podem ser introduzidos na posição apropriada (geralmente acima) de uma forma não heteróloga de um polinucleotídeo da presente invenção, de forma a regular positiva ou negativamente a expressão de um polinucleotídeo da presente invenção. Por exemplo, promotores endógenos podem ser alterados *in vivo* por mutação, deleção, e/ou substituição (ver, U.S. Patent No. 5.565.350; International Patent Application No. PCT/US93/03868), ou promotores isolados podem ser introduzidos em uma célula vegetal na orientação e distância correta de um gene cognato de um polinucleotídeo da presente invenção, de forma a controlar a expressão do gene. A expressão gênica pode ser modulada sob condições adequadas para crescimento vegetal, de forma a alterar a concentração total e/ou alterar a composição dos polipeptídeos da presente invenção em células vegetais. Assim, a presente invenção provê composições, e métodos para fazer promotores e/ou intensificadores heterólogos operacionalmente ligados a uma forma nativa, endógena (i.e., não heteróloga) de um polinucleotídeo da presente invenção.

Se a expressão de polipeptídeo é desejada, é geralmente desejável incluir uma região de poliadenilação na extremidade 3' de uma região codificadora de polinucleotídeo. A região de poliadenilação pode ser derivada do gene natural, de uma variedade de outros genes vegetais, ou de T-DNA. A sequência da extremidade 3' a ser adicionada pode ser derivada de, por exemplo, genes de nopalina sintase ou octopina sintase, ou alternativamente de outro gene vegetal ou, menos preferencialmente, de outro gene eucarionte.

Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem ser projetados para expressão de um polipeptídeo da invenção em células procarióticas (e.g., *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia*; *Bacillaceae*; *Rhizobaceae*, tais como *Rhizobium* e *Rhizobacter*; *Spirillaceae*, tais como fotobactérias; *Zymomonas*; *Serratia*; *Aeromonas*; *Vibrio*; *Desulfovibrio*; *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, tais como *Pseudomonas* e *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* e *Nitrobacteraceae*) ou células eucarióticas (e.g., células de insetos usando vetores de expressão de bacilovírus, células de leveduras, células vegetais, ou células de mamíferos) (ver, Goeddel, *supra*. para uma discussão sobre células hospedeiras adequadas). Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito ou traduzido *in vitro*, usando, por exemplo, sequências reguladoras promotoras T7 e T7 polimerase.

A expressão de proteínas em procariontes é mais freqüentemente conduzida em *E. coli* com vetores compreendendo promotores constitutivos ou induzidos direcionando a expressão tanto de proteínas de fusão ou não de fusão. Vetores de fusão adicionam um número de aminoácidos a uma proteína aí codificada, usualmente ao terminal amino da proteína recombinante. Tais vetores de fusão tipicamente servem ao menos para três propósitos: 1) para aumentar a expressão da proteína recombinante; 2) para aumentar a solubilidade da proteína recombinante; e/ou 3) para adicionar na purificação da proteína recombinante atuando como um ligante em purificação de afinidade. Freqüentemente, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é introduzido na junção da porção de fusão com a proteína recombinante para permitir a separação da proteína recombinante a partir da porção de fusão subsequente à purificação da proteína de fusão. Tais enzimas, e suas seqüências de reconhecimento cognatas, incluem Factor Xa, trombina e enteroquinase. Vetores de expressão de fusão típicos incluem pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fundem glutathione S-transferase (GST), proteína E de ligação a maltose, ou proteína A, respectivamente, para a proteína recombinante alvo.

Em outro avanço, o vetor de expressão é um vetor de expressão de leveduras. Exemplos de vetores para expressão na levedura *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari, et

al., (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz, et al., (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA), e pPicZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA).

5

Alternativamente, o vetor de expressão é um vetor de expressão bacilovírus. Vetores de bacilovírus disponíveis para expressão de proteínas em células de insetos cultivadas (e.g., células Sf 9) incluem a série pAc (Smith, et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) e a série pVL (Lucklow and Summers, (1989) *Virology* 170:31-39).

Ainda em outro avanço, uma molécula de ácido nucléico da invenção é expressa em células vegetais usando um vetor de expressão vegetal incluindo, mas não limitado a, vetores de expressão de vírus de mosaico de tabaco e vírus de batata.

Outros sistemas de expressão adequados para ambas células procariontes e eucariontes são conhecidos na arte (ver, e.g., capítulos 16 e 17 de Sambrook, et al. (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Um número de promotores pode ser usado na prática da invenção. Os promotores podem ser selecionados baseados no resultado desejado. Os ácidos nucléicos podem ser combinados com promotores constitutivos, tecido-

específicos, induzidos, ou outros promotores para expressão no organismo hospedeiro.

Um "promotor tecido-específico" pode direcionar a
5 expressão de ácidos nucleicos da presente invenção em um tecido específico, órgão ou tipo de célula específicos. Promotores tecido-específicos podem ser induzidos. Similarmente, promotores tecido-específicos podem apenas promover a transcrição em um certo período de tempo ou
10 estágio de desenvolvimento naquele tecido. Outros promotores tecido-específicos podem ser ativados ao longo do ciclo de vida de um tecido em particular. Alguém de conhecimento ordinário na arte reconhecerá que um promotor específico de tecido pode dirigir a expressão de seqüências
15 operacionalmente ligadas em tecidos que não o tecido alvo. Assim, como aqui usado, um promotor específico de tecido é um que dirige a expressão preferencialmente no tecido ou tipo de célula alvo, mas pode também levar a alguma expressão em outros tecidos também. Um número de
20 promotores tecido-específicos pode ser usado na presente invenção. Com o promotor apropriado, qualquer órgão pode ser visado, tal como órgãos/estruturas vegetativas (e.g., folhas, caules e tubérculos), raízes, flores e órgãos/estruturas florais (e.g., brácteas, sépalas,
25 pétalas, estames, carpelos, anteras e óvulos), sementes (incluindo embriões, endosperma, e cobertura de semente) e fruto. Por exemplo, promotores que direcionam a expressão de moléculas de ácidos nucleicos em promotores específicos de folhas e/ou órgãos fotossintéticos (tais como promotor

RBCS descrito em Khoudi, et al., (1997) *Gene* 197:343) são úteis para intensificar a fotossíntese. Adicionalmente, expressão tecido-específica pode ser obtida adicionando-se um peptídeo em um polipeptídeo da invenção, que direciona a
5 localização do polipeptídeo anexado aos órgãos fotossintéticos (tais como aqueles descritos em U.S. Patent Application Serial No. 11/150.054).

Um "promotor constitutivo" é definido como um promotor
10 que irá direcionar a expressão de um gene em todos os tecidos e são ativos sob a maioria das condições ambientais e estados de desenvolvimento ou de diferenciação celular. Exemplos de promotores constitutivos incluem a região de iniciação de transcrição de vírus de mosaico de couve-flor
15 (CaMV) 35S, o promotor 1'- ou 2'- derivado de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, e outras regiões de iniciação de transcrição de vários genes vegetais conhecidos daqueles de conhecimento ordinário na arte. Tais genes incluem, por exemplo, *ACT11* de *Arabidopsis* (Huang, et al., (1996) *Plant*
20 *Mol. Biol.* 33:125-139), *Cat3* de *Arabidopsis* (GenBank Accession No. U43147, Zhong, et al., (1996) *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203), o gene codificando proteína desaturase carregadora de estearoil-acil de *Brassica napus* (Genbank Accession No. X74782, Solocombe, et al., (1994) *Plant*
25 *Physiol.* 104:1167-1176), *GPc1* de milho (GenBank Accession No. X15596, Martinez, et al., (1989) *J. Mol. Biol.* 208:551-565), e *Gpc2* de milho (GenBank Accession No. U45855, Manjunath, et al., (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:97-112). Qualquer promotor constitutivo forte, tal como o promotor

CaMV 35S, pode ser usado para a expressão de polinucleotídeos da presente invenção pela planta.

O termo "promotor induzido" refere-se a um promotor
5 que está sob preciso controle ambiental ou por desenvolvimento. Exemplos de condições ambientais que podem afetar a transcrição por promotores induzidos incluem condições anaeróbicas, temperatura elevada, a presença de luz, ou borrifamento com químicos/hormônios.

10

Promotores constitutivos adequados para uso em uma célula vegetal hospedeira incluem, por exemplo, o promotor núcleo do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos relacionados (International Publication No. WO 99/43838 and
15 U.S. Patent No. 6.072.050); o promotor núcleo CaMV 35S (Odell, et al., (1985) *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy, et al., (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 and Christensen, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-
20 689); pEMU (Last, et al., (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (U.S. Patent No. 5.659.026), e similares (e.g., U.S. Patent Nos. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463;
25 5.608.142; e 6.177.611).

Outro aspecto da invenção refere-se a células hospedeiras nas quais um vetor de expressão recombinante da invenção foi introduzido. Os termos "célula hospedeira" e

"célula hospedeira recombinante" são aqui usados intercambiavelmente. É entendido que tais termos referem-se não apenas à célula objeto em particular, mas à progênie ou progênie potencial de tal célula. Como certas
5 modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido tanto a mutação ou influências ambientais, tal progênie pode, na verdade, não ser idêntica à célula parental, mas ainda é incluída no escopo do termo, como aqui usado.

10 Conseqüentemente, a presente invenção provê uma célula hospedeira tendo um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico da invenção, ou um variante desse. Uma célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica (e.g., *E. coli*, *Bacillus thuringiensis*) ou
15 eucariótica (e.g., células de insetos, leveduras ou células vegetais). A invenção também provê um método para expressar uma molécula de ácido nucléico da invenção, fazendo, assim, o polipeptídeo codificado compreendendo as etapas de i) cultivar uma célula compreendendo uma molécula
20 de ácido nucléico da invenção sob condições que permitem a produção do polipeptídeo codificado; e ii) isolar o polipeptídeo expresso.

O DNA do vetor pode ser introduzido em células
25 procarióticas ou eucarióticas via técnicas de transformação ou transfecção convencionais. Como aqui usado, os termos "transformação" e "transfecção" devem referir-se a uma variedade de técnicas reconhecidas na arte para introduzir moléculas de ácidos nucléicos estrangeiras em uma célula

hospedeira, incluindo co-precipitação de fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextran, lipofecção, eletroporação, *Agrobacterium tumefaciens*, e infiltração a vácuo. Métodos adequados para transformar ou
 5 transfectar células hospedeiras podem ser encontrados na arte (e.g., Sambrook, et al., supra.).

Produção de Plantas transgênicas

10 Qualquer método conhecido na arte pode ser usado para transformar uma planta ou célula vegetal com uma molécula de ácido nucléico da presente invenção. Moléculas de ácidos nucléicos podem ser incorporadas em DNA vegetal (e.g., DNA genômico ou DNA de cloroplasto) ou ser mantidas
 15 sem inserção no DNA vegetal (e.g., através do uso de cromossomos artificiais). Métodos adequados de introduzir moléculas de ácidos nucléicos em células vegetais incluem microinjeção (Crossway, et al., (1986) *Biotechniques* 4:320-334); eletroporação (Riggs, et al., (1986) *Proc. Natl.*
 20 *Acad. Sci.* 83:5602-5606; D'Halluin, et al., (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505); transformação mediada por *Agrobacterium* (U.S. Patent Nos. 5.563.055 e 5.981.840, Osjoda, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750; Horsch, et al., (1984) *Science* 233:496-498; Fraley, et al., (1983) *Proc.*
 25 *Natl. Acad. Sci.* 80:4803; e *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed., Springer-Verlag, Berlin 1995); transferência de gene direta (Paszkowski, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722); aceleração balística de partículas (U.S. Patent Nos. 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244; 5.932.782;

Tomes, et al., (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment, in Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips, Springer-Verlag, Berlin; e McCabe, et al., (1988) *Biotechnology* 6:923-926); transformação mediada por vírus (U.S. Patent Nos. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 and 5.316.931); transformação de pólen (De Wet, et al., (1985) in The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman, et al., Longman, New York, pp. 197-209); transformação Lec 1 (U.S. Patent Application Ser. No. 09/435.054; International Publication No. WO 00/28058); transformação mediada por fios de carbeto de silício (Kaeppler, et al., (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418; Kaeppler, et al., (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566); e tecnologia de transformação de cloroplasto (Bogorad, (2000) *Trends in Biotechnology* 18:257-263; Ramesh, et al., (2004) *Methods Mol Biol.* 274:301-7; Hou, et al., (2003) *Transgenic Res.* 12:111-4; Kindle, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1721-5; Bateman and Purton, (2000) *Mol Gen Genet.* 263:404-10; Sidorov, et al., (1999) *Plant J.* 19:209-216).

A escolha de protocolos de transformação usados para gerar plantas transgênicas e células vegetais transgênicas pode variar dependendo do tipo de planta ou célula vegetal, i.e., monocotiledônea ou dicotiledônea, visada para transformação. Exemplos de protocolos de transformação particularmente adequados para um tipo de planta em particular incluem aqueles para: batata (Tu, et al., (1998) *Plant Molecular Biology* 37:829-838; Chong, et al., (2000)

Transgenic Research 9:71-78); soja (Christou, et al., (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674; McCabe, et al., (1988) *BioTechnology* 6:923-926; Finer and McMullen, (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182; Singh, et al., (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324); milho (Klein, et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4305-4309; Klein, et al., (1988) *Biotechnology* 6:559-563; Klein, et al., (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444; Fromm, et al., (1990) *Biotechnology* 8:833-839; Tomes, et al., (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin)); cereais (Hooykaas-Van Slogteren, et al., (1984) *Nature* 311:763-764; U.S. Patent No. 5.736.369).

15

Em alguns avanços, mais de uma construção é usada para transformação na geração de plantas e células vegetais transgênicas. Múltiplas construções podem ser incluídas nas posições *cis* ou *trans*. Em avanços preferidos, cada construção possui um promotor e outras seqüências reguladoras.

20

As plantas transgênicas podem expressar o transgene de qualquer meio conhecido na arte incluindo, mas não se limitando a, expressão constitutiva, expressão regulada por desenvolvimento, e expressão específica de tecido. Em um avanço específico, promotores que direcionam a expressão de moléculas de ácidos nucleicos em folhas e/ou órgãos fotossintéticos (tais como o promotor *RBCS* descrito em

25

Khoudi, et al., *Gene* 197:343) são usados para expressar as moléculas de ácidos nucléicos e/ou polipeptídeos da invenção.

5 Células vegetais transformadas, que são derivadas por qualquer das técnicas de transformação acima, podem ser cultivadas para gerar uma planta inteira que possui o genótipo transformado e, assim, o fenótipo desejado. Tais técnicas de regeneração confiam na manipulação de certos
10 fito-hormônios em um meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente confiando em um marcador de biocida e/ou herbicida que foi introduzido junto com as seqüências de nucleotídeos desejadas. A regeneração de plantas a partir de protoplastos cultivados é descrita na arte (e.g.,
15 Evans, et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillilan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985). A regeneração pode ser também obtida a partir de calos
20 vegetais, explantes vegetais, órgãos vegetais, ou partes desses. Tais técnicas de regeneração são também descritas na arte (e.g., Klee, et al., (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys* 38:467-486).

25 O termo "planta" inclui plantas inteiras, órgãos/estruturas de brotos vegetativos (e.g. folhas, caules e tubérculos), raízes, flores e órgãos/estruturas florais (e.g. brácteas, sépalas, pétalas, estames, carpelos anteras e óvulos), sementes (incluindo embriões,

endosperma, e cobertura de semente) e fruto (o ovário maduro), tecido vegetal (e.g. tecido vascular, tecido de solo, e similares) e células (e.g. células de guarda, células de ovos, tricomas e similares), e progênie das
 5 mesmas. A classe de plantas que pode ser usada em métodos da presente invenção inclui a classe de plantas superiores e inferiores passíveis de técnicas de transformação, incluindo angiospermas (plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas), gimnospermas, samambaias, e algas
 10 multicelulares. Plantas de uma variedade de níveis de ploidia, incluindo aneuplóides, poliplóides, diplóides, haplóide e plantas hemizigóticas são também incluídas.

As moléculas de ácidos nucléicos da invenção podem ser
 15 usadas para conferir traços desejados essencialmente em qualquer planta. Assim, a invenção possui uso sobre uma ampla gama de plantas, incluindo espécies dos gêneros *Agrotis*, *Allium*, *Ananas*, *Anacardium*, *Apium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Athamantha*, *Atropa*, *Avena*, *Bambusa*, *Beta*,
 20 *Brassica*, *Bromus*, *Browaalia*, *Camellia*, *Cannabis*, *Carica*, *Ceratonia*, *Cicer*, *Chenopodium*, *Chicorium*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Coix*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Datura*, *Daucus*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Elaeis*, *Eliusine*,
 25 *Euphorbia*, *Festuca*, *Ficus*, *Fragaria*, *Geranium*, *Glycine*, *Graminae*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hevea*, *Hibiscus*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lathyrus*, *Lens*, *Lilium*, *Linum*, *Lolium*, *Lotus*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Macadamia*, *Macrophylla*, *Malus*, *Mangifera*, *Manihot*,

Majorana, Medicago, Musa, Narcissus, Nemesia, Nicotiana,
Onobrychis, Olea, Olyrae, Oryza, Panicum, Panicum,
Panieum, Pannisetum, Pennisetum, Petunia, Pelargonium,
Persea, Pharoideae, Phaseolus, Phleum, Picea, Poa, Pinus,
5 *Pistachia, Pisum, Populus, Pseudotsuga, Pyrus, Prunus,*
Pseutotsuga, Psidium, Quercus, Ranunculus, Raphanus, Ribes,
Ricinus, Rhododendron, Rosa, Saccharum, Salpiglossis,
Secale, Senecio, Setaria, Sequoia, Sinapis, Solanum,
Sorghum, Stenotaphrum, Theobromus, Trigonella, Trifolium,
10 *Trigonella, Triticum, Tsuga, Tulipa, Vicia, Vitis, Vigna, e*
Zea.

Em avanços específicos, plantas transgênicas são
 plantas de milho, tomate, batata, arroz, soja, algodão,
 15 girassol, alfafa, alface, canola, sorgo, ou plantas de
 tabaco.

Plantas transgênicas podem ser cultivadas e
 polinizadas tanto com a mesma linhagem transformada ou
 20 linhagens diferentes. Duas ou mais gerações das plantas
 podem ser cultivadas para garantir que a expressão da
 molécula de ácido nucléico desejada, polipeptídeo e/ou
 característica fenotípica esteja estavelmente mantida e
 herdada. Alguém de conhecimento ordinário na arte
 25 reconhecerá que, após a molécula de ácido nucléico da
 presente invenção ser estavelmente incorporada em plantas
 transgênicas e confirmada por ser operacional, ela pode ser
 introduzida em outras plantas por cruzamento sexuada.

Qualquer de um número de técnicas de cruzamento padrão pode ser usada, dependendo da espécie a ser cruzada.

Determinação de Expressão em Plantas transgênicas

5

Qualquer método conhecido na arte pode ser usado para determinar o nível de expressão em uma planta de uma molécula de ácido nucléico da invenção ou polipeptídeo codificado a partir daí. Por exemplo, o nível de expressão de um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico da invenção em uma planta pode ser determinado usando técnicas moleculares incluindo, mas não se limitando a, teste imuno, imunoprecipitação, eletroforese de gel, e eletroforese de gel quantitativa.

15

Adicionalmente, o nível de expressão em uma planta de um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico da invenção pode ser determinado pelo grau ao qual o fenótipo vegetal (incluindo, mas não se limitando a, taxas de fotossíntese, taxas de crescimento, e produção de sementes) é alterado sob condições aquecidas, comparado a plantas expressando RuBisCo Ativase de tipo selvagem.

Adicionalmente, extratos ou polipeptídeos isolados de plantas transgênicas, tecidos dessas, ou células dessas podem ser usados em testes *in vitro*.

Os conteúdos de todos artigos, livros, manuais de referência e resumos publicados aqui citados, são, por meio

deste, incorporados por referência em sua integridade para descrever mais completamente o estado da arte a qual a invenção pertence.

5 Como várias mudanças podem ser feitas na matéria acima descrita sem sair do escopo e espírito da presente invenção, pretende-se que todo assunto contido na descrição acima, e/ou definido nas reivindicações em anexo, seja interpretado como descritivo ilustrativo da presente
10 invenção. Modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos ensinamentos acima.

EXEMPLOS

15 Exemplo 1: Isolando polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase

Bibliotecas de RuBisCo Ativase foram geradas a partir de um único embaralhamento de genes (ver, e.g., Cramer, *et al.*,
20 (1998) *Nature*. 391(6664):288-91; Chang, *et al.*, (1999) *Nat Biotechnol.* 17(8):793-7; Ness, *et al.*, (1999) *Nat Biotechnol.* 17(9):893-6; Christians, *et al.*, (1999) *Nat Biotechnol.* 17(3):259-64 e US Patent Nos. 6.605.430; 6.117.679; e 5.605.793) e embaralhamento sintético (ver,
25 e.g., US Patent No. 6.436.675 e International Publication Nos. WO 00/42561; WO 01/23401; WO 00/42560; e WO 00/42559) usando RuBisCo Ativase de tipo selvagem de SEQ ID NO: 1 como modelo.

Resumidamente, *Arabidopsis* RNA foi isolada a partir de folhas verdes usando reagente Trizol[®] de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen). DNAc de RCA (GenBank accession number NM 179990) foi clonado por PCR em vetor TOPO[®] (Invitrogen) usando o kit de PCR *RT-PCR Kit TITANIUM™* de uma etapa (BD Biosciences-Clontech). Para embaralhamento de gene único na primeira rodada, a forma RCA curta madura (região codificadora V59 para K438) foi amplificada por PCR (Qiagen *Taq* DNA polimerase ou 10 *Stratagene Mutazyme* DNA polimerase), fragmentada, e reagrupada em uma reação de PCR sem *primer* nos genes embaralhados foram, então, resgatados com os *primers* flanqueando que contêm um sítio *NcoI* (5') e um sítio *BamHI*, região codificadora 6x-His e um códon de parada (3'). A 15 biblioteca de variantes foi clonada em um vetor de expressão de *E. coli* (pET16b, Novagen) digerido com *NcoI* e *BamHI*. Para aumentar o *pool* genético na primeira rodada, embaralhamento sintético foi conduzido usando a diversidade de trigo, arroz, algodão, espinafre e pepino (ver, Ness, et 20 *al.*, (2002) *Nat Biotechnol.* 20:1251-1255). Uma segunda rodada de embaralhamento de genes, usando os variantes da primeira rodada como pais, foi realizada como previamente descrito por Cramer, *et al.*, (1998) *Nature* 15:288-291. Polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase com 25 termoestabilidade melhorada foram isolados pela seguinte metodologia de rastreamento.

Primeira bancada: Teste de ativação de Rubisco. Culturas de *E. coli* expressando um polipeptídeo derivado de rubisco

ativase foram empelotadas a 4°C, 3.500 rpm por 15 minutos e armazenadas em uma placa de PCR de 96 poços com fundo em V a -80°C. Lisado de células de *E. coli* foi preparado descongelando as culturas em temperatura ambiente por 5 minutos, adicionando 75µl de tampão de sonicação (100mM Tricina KOH pH 8,0; 20mM ascorbato; 3mM Mg-ATP; 10mM MgCl₂; 10% v/v glicerol; 10mM βme; x3,33 inibidor de protease; 1 µl/ml benzonase; 1 mg/ml lisosima) para cada poço, e agitando a placa por 60 minutos a 4°C até que a pelota
10 tenha sido lisada. As placas foram sonicadas com sonicador de microplacas MISONIX por 1 minuto e, então, resfriadas por 1 minuto. Esse processo foi repetido quatro vezes. As culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante que continha proteína solúvel foi
15 usado nos testes de ativação de Rubisco.

Vinte e dois µl do sobrenadante de *E. coli* foi transferido para uma placa de cintilação de 96 poços com fundo em U e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos
20 (e usado como o lisado para "condições normais" nos testes). O tratamento por calor do lisado foi efetuado transferindo 35 µl do sobrenadante de *E. coli* para uma placa de PCR de 96 poços de fundo em V e incubando a 40°C por 15 minutos. O sobrenadante tratado com calor foi,
25 então, transferido para uma placa de cintilação de 96 poços com fundo em U (e usado como o lisado para "condições aquecidas" nos testes). Ambas as placas foram incubadas por 5 minutos a 4°C antes da realização do teste.

A ativação de Rubisco foi testada incubando-se o lisado de células contendo RuBisCo Ativase ou um polipeptídeo derivado de rubisco ativase com Rubisco *Arabidopsis* desativada purificada (15 µg) no tampão de reação (100mM Tricina KOH pH 8,0; 10mM MgCl₂; 10 mM [14C]NaHCO₃; Mg-ATP; 4mM RuBP; 1mM PEP; 40 µg/ml piruvato quinase) a temperatura ambiente por 15 minutos (ver, Shen, *et al.*, (1991) *J. Biol. Chem.* 266:8963-8968). A ativação de Rubisco por lisado de células expressando polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase foi terminada pela adição de 1 N HCl, e a incorporação de ¹⁴CO₂ determinada por espectroscopia de cintilação líquida.

A Rubisco usada no teste acima descrito foi purificada a partir de folhas de *Arabidopsis*. As folhas foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido antes da ressuspensão em tampão de extração (100mM Hepes-KOH pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; 3mM DDT; 0,5 mM PMSF; 10mM MgCl₂; 10mM NaHCO₃). A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 20min a 4°C e o sobrenadante foi coletado. O sobrenadante foi mantido em gelo sob agitação contínua enquanto sulfato de amônio era adicionado a uma concentração final de 35% de saturação e centrifugado a 12.000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi agitado por 30 min adicionais. Com sulfato de amônio a uma concentração final de 55% de saturação antes da centrifugação a 12.000 rpm por 20min a 4°C. A pelota foi dissolvida em tampão de extração e depois precipitada com polietileno glicol a 18% e centrifugação. A pelota foi ressuspensa em tampão de extração (cerca de

1 ml/ 40ml de sobrenadante original) e centrifugada a 13.000 rpm por 30 min a 4°C. A Rubisco purificada foi no sobrenadante e glicerol adicionada a uma concentração final de 10%.

5

A Rubisco purificada foi desativada pelo seguinte protocolo (ver, Wang, et al., (1992) *Plant Physiol.* 100:1858-1862). Dez mM de DTT foram adicionados à Rubisco purificada e incubados a 45°C por 10 min. Um ml da mistura
10 foi adicionado a uma coluna de 20ml de Sephadex G-50 equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM Tricina-KOH pH 8,0 e 0,5 mM EDTA pH 8,0). A Rubisco desativada foi eluída a partir da coluna pela adição de tampão de equilíbrio. A Rubisco desativada eluída foi coletada e incubada a
15 temperatura ambiente por 1 hora antes da incubação em gelo por uma hora na presença de 4 mM RuBp.

Segunda bancada: perfil de temperatura HTP de ativação de Rubisco por lisado de células de clones ativos. Clones de
20 interesse identificados no rastreamento da primeira bancada foram ainda caracterizados na segunda bancada de rastreamento. O lisado de células de cada clone ativo foi testado novamente como descrito acima exceto que o tratamento de temperatura foi conduzido em quatro
25 temperaturas diferentes (16°C, 25°C, 40°C, e 45°C) antes do teste. Clones que possuíam perfil de termoestabilidade relativamente melhorado comparado a RuBisCo Ativase de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2) foram selecionados para a 3ª bancada de rastreamento.

Terceira bancada: Perfil de temperatura de ativação de Rubisco por variantes purificados de RuBisCo Ativase. Para determinar a atividade específica dos polipeptídeos derivados identificados pelas primeiras duas bancadas de rastreamento, polipeptídeos purificados por afinidade foram pré-incubados em diferentes temperaturas e, então, analisados para sua habilidade de ativa Rubisco a 25°C. Como a RuBisCo Ativase catalisa a Rubisco desativada de uma maneira dependente de tempo, cada reação foi monitorada por 15 minutos em intervalos de 3 minutos. A razão de RuBisCo Ativase: Rubisco foi estabelecida a 1:40 similarmente à razão em folhas de plantas. A termoestabilidade de RuBisCo Ativase de tipo selvagem (SEQ ID NO: 2) e polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase é apresentada na Tabela 2. A termoestabilidade percentual representa a quantidade de Rubisco que foi ativada pela RuBisCo Ativase a 40°C como um percentual da quantidade de Rubisco que foi ativada por RuBisCo Ativase a 25°C.

Exemplo 2: Caracterização *In vitro* de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase

Os polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase isolados no Exemplo 6.1 foram testados *in vitro* em três diferentes testes para determinar a atividade específica a 25°C e 40°C e sua termoestabilidade (t.s.). Em todos os casos, os resultados obtidos com RuBisCo Ativase de tipo selvagem a 25°C foram estabelecidos a 100%.

Ativação de Rubisco desativada. Polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase purificados foram testados como descrito no teste da primeira bancada do Exemplo 1, à exceção de que os polipeptídeos derivados foram incubados a 40°C ou 45 °C por 15, 30, 45 ou 60 minutos antes da realização do teste de ativação de Rubisco. Os resultados são apresentados nas colunas 2-4 da Tabela 3. A coluna 2 da Tabela 3 representa a quantidade de Rubisco ativada que é obtida após a incubação de Rubisco desativada com RuBisCo Ativase a 25°C. Não foram usadas condições aquecidas. A coluna 3 da Tabela 3 representa a quantidade de Rubisco que foi ativada por RuBisCo Ativase após um tratamento de aquecimento de 15 min a 40°C como um percentual da quantidade de Rubisco que foi ativada por RuBisCo Ativase a 25°C. A coluna 4 da Tabela 3 representa a quantidade de Rubisco que foi ativada por RuBisCo Ativase com um tratamento de calor de 45 min a 40°C como um percentual da quantidade de Rubisco que foi ativada pela RuBisCo Ativase sem tratamento de calor (a 25°C).

A ativação de Rubisco por polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase 301C7 e 382D8 exibe alta termoestabilidade nos tratamentos a 40°C e 45°C (FIG. 1A). A atividade de 382D8 após o tratamento a 45°C foi 80% maior do que RCA1 no mesmo tratamento de temperatura e apenas 10% menor do que a atividade de RCA1 incubada a 25°C.

Ativação de Rubisco sob condições catalíticas. Polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase purificados foram testados como descrito no teste da primeira bancada

do Exemplo 1, com exceção de que o teste foi realizado sob condições aquecidas (i.e., 40°C) (Crafts-Brandner and Salvucci, (2000) *PNAS* 97:13430-13435). Os resultados são apresentados nas colunas 5-6 da Tabela 3. A coluna 5 da Tabela 3 representa a quantidade de Rubisco ativada que é obtida após a incubação de Rubisco desativada com RuBisCo Ativase a 25°C. Condições aquecidas não foram usadas. A coluna 6 da Tabela 3 representa a quantidade de Rubisco que foi ativada por RuBisCo Ativase quando o teste é conduzido a 40°C como um percentual da quantidade de Rubisco que foi ativada por RuBisCo Ativase quando o teste é conduzido a 25°C.

RCA de tipo selvagem manteve um estado de ativação de Rubisco de 0,5 a 40°C, enquanto polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase 183H12, 301C7, e 382D8 foram capazes de manter os estados de ativação de 0,62-0,72 sob as mesmas condições (FIG. 1B). Em relação às reações a 25°C, o estado de ativação de Rubisco mantido pelos variantes termoestáveis a 40°C esteve na faixa de 78-98%, versus 70% para a enzima de tipo selvagem. A proteína apresentando a atividade específica mais alta a tanto 25°C ou 40°C foi o melhor variante isolado na primeira rodada, 183H12.

Atividade de ATPase. Como a RuBisCo Ativase é uma ATPase (o polipeptídeo contém o domínio AAA⁺) que requer que ATP se solte da ligação de Rubisco para açúcares de fosfato, o efeito da temperatura na hidrólise de ATP por RuBisCo Ativase foi testado. O teste de ATPase que monitorou a

atividade intrínseca do complexo de ativase, independente de sua interação com Rubisco é comumente usado para caracterização de RuBisCo Ativase. O teste de ATPase foi efetuado como descrito por Salvucci ((1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 298:688-696). Os resultados são apresentados nas colunas 7-8 da Tabela 3. A coluna 7 da Tabela 3 representa a quantidade de ATP hidrolisado que está presente após a incubação de RuBisCo Ativase com ATP a 25°C. Condições aquecidas não foram usadas. A coluna 8 da Tabela 3 representa a quantidade de ATP hidrolisado que está presente após a incubação com RuBisCo Ativase que foi tratada por calor a 40°C como um percentual da quantidade de ATP hidrolisado que está presente após incubação com RuBisCo Ativase que não foi tratada.

A FIG. 1C mostra que a estabilidade de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase 301C7 e 382D8 a 35°C e 40°C foi melhorada mais do que 10 vezes comparado a RCA1, enquanto 183H12 exibiu 20% e 30% de melhoramento a 25°C e 40°C, respectivamente.

Exemplo 3: Complementação de Mutante de Deleção de RuBisCo Ativase

Para expressar variantes embaralhados em uma base homozigota para a deleção ($\Delta rca/\Delta rca$) (ver, Li, et al., (2001) *Plant J.* 27:235-242) a seguinte cascata de complementação foi desenvolvida: 1) Seleção de plantas heterozigotas para a deleção por HTP-PCR usando método de

extração de DNA de folha simples de 96 poços (Xin, et al., (2003) *BioTechniques* 34:820-826), com *primers* específicos para os alelos de tipo selvagem e deletados. 2) Transformação com o gene de interesse. 3) Seleção T0 para resistência a antibióticos e análise de PCR para homoziguidade. 4) Auto polinização das plantas homozigotas resultantes para obter linhagens transgênicas T1.

10 A análise de *imunoblot* de plantas de tipo selvagem heterozigotas e homozigotas (base genética RCA/RCA, RCA/ Δ rca and Δ rca / Δ rca respectivamente) revelou que os produtos gênicos (formas longas e curtas) foram expressos em níveis similares nas plantas de tipo selvagem e heterozigotas (FIG. 2A). A ausência das isoformas curtas e longas em plantas homozigotas para a deleção confirmou que a mutação anula a expressão de ambas as plantas RCA1 e RCA2. Plantas Δ rca cultivadas em CO₂ ambiente exibiram baixo desempenho fotossintético (valores F_q'/F_m') comparado às de tipo selvagem ($0,185 \pm 0,038$ e $0,332 \pm 0,033$ respectivamente) (FIG. 2B) e área foliar significativamente menor após 3 semanas em solo ($2,93 \pm 0,49$ e $395,4 \pm 8,75 \text{mm}^2$ respectivamente) (FIG. 2C). Homozigotos Δ rca de dois meses de idade estavam severamente abalados e cloróticos por 25 comparação com plantas de tipo selvagem (FIG. 2D).

Baseado na análise de sequência e mapeamento do fragmento deletado, dois grupos de *primers* foram designados: *primers* RCA (*forward* 5'-CAGACAATGTTGGCCTC-3'

(SEQ ID NO: 23) e reverso 5'-ACGAGTAACGATGGTAGG-3' (SEQ ID NO: 24)) específicos para o alelo de tipo selvagem que fornecem o produto de 1,5 kb, e *primers rca* (*forward* 5'-GTCTATACCTTGAGC-3' (SEQ ID NO: 25) e reverso 5'-TCAGTCATACTCGG-3' (SEQ ID NO: 26)) que fornecem o produto de 1,5 kb no alelo deletado e 4,9 kb no alelo de tipo selvagem (FIG. 3A). Para amplificar o produto de 1,5 kb com os *primers rca*, mas não o de 4,9 kb, o ciclo de amplificação por PCR foi estabelecido a 1,5 min. Aqueles grupos de *primers* foram utilizados para caracterizar a base genética das plantas T1. Como o hospedeiro de transformação foi heterozigoto para deleção do lócus *rca* endógeno, as plantas T1 expressando os transgenes de RuBisCo Ativase são uma mistura de (*RCA/RCA*) heterozigotos (*RCA/Δrca*) e homozigotos (*Δrca /Δrca*) de tipo selvagem. Linhagens transgênicas expressando a variante embaralhada 183H12 em diferentes bases genéticas foram identificadas usando rastreamento por PCR (FIG. 3B) e análise de *immunoblot* (FIG. 3C). Plantas que expressam 183H12 em bases genéticas contendo ao menos um alelo de tipo selvagem (#13; wt, #12; heterozigoto para a deleção) possuem ambas formas longas e curtas da proteína. Na linhagem #2 (homozigoto para deleção) apenas a forma curta foi detectada porque o transgene foi projetado para expressar apenas a forma curta da proteína.

Exemplo 4: Caracterização de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase In planta

Para determinar o efeito da RuBisCo Ativase melhorada sob temperaturas normais e aumentadas, o mutante de deleção de RuBisCo Ativase de *Arabidopsis* (Δrca) (ver Exemplo 3). Δrca foi funcionalmente complementado com RuBisCo Ativase de tipo selvagem (SEQ ID NO: 1), polipeptídeo derivado de rubisco ativase 183H12 da 1ª rodada (SEQ ID NO: 7) e dois polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase 382D8 (SEQ ID NO: 15) e 301C7 (SEQ ID NO: 19) da 2ª rodada.

10 Para expressar a RuBisCo Ativase de tipo selvagem e os polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase em plantas *Arabidopsis* transgênicas (Δrca), os transgenes codificando o peptídeo trânsito de cloroplasto e a região codificadora de *rca1* ou, os polipeptídeos derivados, foram clonados em
15 pMAXY4384 que contém o promotor de Caulimovirus de Mosaico de Mirabilis (MMV) com um domínio intensificador duplo (Day & Maiti, (1999) *Transgenics* 3:61-70), o terminador de UBQ3 e o gene de resistência a canamicina *nptII*. Mutantes RCA Deleteagene™ heterozigotos foram transformados por
20 *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 usando o método de imersão floral (Clough, et al., (1998) *Plant J.* 16:735-743). Para confirmar expressão, proteína foi extraída de tecido vegetal (2-3 g peso fresco) em N₂ líquido e 1 ml de tampão de extração (100 mM de Tricina-KOH pH 8, EDTA pH 8,
25 10 mM 2-mercaptoetanol, e coquetel inibidor de Protease Set V). O extrato cru foi clarificado por centrifugação sucessiva por 5 min a 3000 g, e 20 min a 12.000 g. Dez microgramas de extrato de proteína solúvel foram separadas em géis de 10% SDS-poliacrilamida e transferidos para uma

membrana de nitrocelulose (de acordo com as instruções fornecidas pela *Invitrogen*). O *blot* foi imunodecorado com os anticorpos policlonais criados contra a *Arabidopsis* RCA1 recombinante e as proteínas foram detectadas usando o *kit* de substrato conjugado Ap (Bio-Rad).

Como mostrado na FIG. 4A, plantas de tipo selvagem (RCA/RCA) expressaram isoformas curtas e longas de ativase, enquanto linhagens transgênicas Δrca complementadas pelos transgenes expressaram apenas a isoforma curta de 43kDa. Sob condições de cultura de 22°C (plantas cultivadas em 16 horas de luz (ciclos de 225 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8 horas no escuro), as linhagens transgênicas exibiram taxas de crescimento similar às plantas não transformadas de tipo selvagem (FIG. 4B). O desempenho fotossintético (eficiência de operação de fotossistema II F_q'/F_m') e taxas de crescimento foram analisados usando o sistema de imagem de fluorescência de clorofila a (FluorImager, Qubit Systems) como previamente descrito (Baker, et al., (2001) *J Exp. Bot.* 52:615-621). Os valores de F_q'/F_m' de linhagens de deleção transgênicas expressando RCA1 ou polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase 183H12, 301C7, ou 382D8 (Δrca RCA1, Δrca 183H12, Δrca 301C7 e Δrca 382D8, respectivamente) foram similares a plantas não transformadas de tipo selvagem, indicando que a expressão da forma curta é suficiente para a complementação funcional de Δrca sob condições de crescimento normais (FIG. 4C). Sob essas condições, a atividade fotossintética medida pelo analisador de gás infravermelho portátil (LI6400, Li-Cor)

sob 150 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 350 μbar CO_2 . de $\Delta\text{rcaRCA1-1}$ foi similar a $\Delta\text{rca183H12-3}$, $\Delta\text{rca301C7-3}$ e $\Delta\text{rca382D8-1}$ (FIG. 4D). A exposição temporária a 30°C por 1hr resultou em 12% fotossíntese decrescida em $\Delta\text{rcaRCA1-1}$. Conseqüentemente, as linhagens $\Delta\text{rca183H12-3}$, $\Delta\text{rca301C7-3}$ e $\Delta\text{rca382D8-1}$ apresentaram fotossíntese aumentada em 16, 22 e 16% após 1 hr a 30°C.

Como a exposição de plantas *Arabidopsis* a 30°C causa pouca indução de proteínas de choque de calor (tipicamente induzidas a 32°C e acima) e efeitos menores na abertura de estômatos (Salvucci, et al., (2001) *Plant Physiol.* 127:1053-1064), o crescimento sob tratamento de calor prolongado foi conduzido com plantas *Arabidopsis* expressando RuBisCo Ativase de tipo selvagem ou termoestável. Linhagens transgênicas de quatro semanas de idade expostas por duas semanas a estresse de calor moderado. As condições de crescimento foram de 16 horas de luz a 225 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 8 horas de escuro. Durante o ciclo de luz, as plantas foram cultivadas a 22°C por 6 horas, e então, rapidamente aumentado para 30°C (2°C por min) por 4 horas e, então, retornaram a 22°C para o complemento do ciclo luminoso. Durando o ciclo escuro, as plantas permaneceram a 22°C. A caracterização de crescimento, biomassa, e produção foi efetuada como previamente descrito (Barth, et al., (2003) *Heredity.* 91:36-42). As plantas apresentaram fenótipo e coloração de folha normal, mas variaram em tamanho (FIG. 5A). $\Delta\text{rcaRCA1}$ (linhagens 1, 8 e 9) foram abaladas em comparação a plantas

não transformadas de tipo selvagem e às linhagens Δrca que expressam os polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase (FIG. 5B). *Arabidopsis* transgênica expressando 183H12-3 que possui a mais alta atividade específica *in vitro* foram as maiores plantas. As linhagens que expressaram 301C7 e 382D8 foram maiores do que as linhagens $\Delta rcaRCA1$, mas não alcançaram os níveis de área foliar das linhagens 183H12. Enquanto as linhagens Δrca expressando apenas a forma curta do gene (RCA1) de tipo selvagem foram menores do que as linhagens não transformadas de tipo selvagem (expressando ambas as formas, curta e longa), a maioria das linhagens transgênicas expressando os polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase exibiram maior área foliar do que as plantas não transformadas de tipo selvagem (FIG. 5B), e todas as linhagens expressando os polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase foram significativamente maiores ($P=0.01$) do que transformantes Δrca expressando RCA1.

As plantas de quatro semanas de idade expostas a duas semanas de estresse de calor moderado também apresentaram diferenças em taxas de desenvolvimento vegetal. Ao final do período de tratamento 74, 44 e 33% de $\Delta rca183H12$, $\Delta rca301C7$ e $\Delta rca382D8$, respectivamente, possuíam inflorescências maduras com flores abertas, enquanto 100% das plantas de tipo selvagem não transformadas e 88% das linhagens $\Delta rcaRCA1$ possuíam inflorescências imaturas emergentes sem flores abertas (dados não apresentados). Adicionalmente, 12% das linhagens $\Delta rcaRCA1$ estavam no estágio vegetativo sem inflorescências visíveis. Sob

condições de crescimento normais, as plantas *Arabidopsis* floresceram após quatro semanas. Portanto, a porcentagem relativamente alta das linhagens *Arca183H12*, *Arca301C7* e *Arca382D8* apresentando desenvolvimento normal é provável devido à termoestabilidade melhorada de RCA que minimizou a inibição da fotossíntese e crescimento sob condições de estresse de calor moderadas.

A melhor linhagem de cada variante foi melhor analisada para atividade fotossintética durante o ciclo de estresse de calor moderado (após 2hr a 30°C). As linhagens transgênicas apresentaram um padrão de fixação de CO₂ que se correlacionou com a área foliar. As taxas de fixação de CO₂ nas linhagens *Arca183H12-3*, *Arca301C7-3* e *Arca382D8-1* foram 30, 25 e 23% maiores, respectivamente, do que na linhagem *ArcaRCA1-1*. Esses resultados demonstraram que a RuBisCo Ativase é um fator limitante na fotossíntese sob condições experimentais.

Plantas maduras (10 semanas de idade) expostas por 8 semanas a estresse de calor moderado foram similares em aparência. Um efeito positivo leve na altura de planta foi detectado nas linhagens *Arca183H12-3*, *Arca301C7-3* e *Arca382D8-1* (116, 121 e 119% respectivamente) comparado a *ArcaRCA1-1* (FIG. 5D). Uma diferença dramática foi observada no número de siliquas por planta, que foi de $130,8 \pm 48,2$, $84,3 \pm 19,6$ e $100,8 \pm 26,9$ para *Arca183H12-3*, *Arca301C7-3* e *Arca382D8-1* (respectivamente) comparado com

40,2 $\pm$ 16,3 e 47,5 $\pm$ 15,8 para Δ rcaRCA1-1 e a de tipo selvagem, respectivamente (FIG. 5E).

Para confirmar que a formação relativamente melhorada
5 de siliquas em transformantes expressando RCA melhorada não
foi por conta do tamanho individual de semente, os pesos de
lotes de 1000 sementes foram comparados. Como mostrado na
FIG. 5F, Δ rcal83H12-3, e Δ rca382D8-1 produziram sementes
levemente maiores (18 e 32% respectivamente) do que
10 Δ rcaRCA1-1, enquanto o peso de sementes de plantas
 Δ rca301C7-3 e plantas de tipo selvagem foi similar àquele
de Δ rcaRCA1-1.

Para analisar melhor o efeito de RCA melhorada no
15 crescimento sob estresse de temperatura moderado, linhagens
T3 expressando o clone mais ativo a 25°C (*in vitro*),
183H12, foram cultivadas continuamente a 26°C sob maior
intensidade de luminosidade e umidade do que no experimento
prévio. As condições de crescimento foram de 16 horas de
20 luz a 300 μ mol fótons m⁻² s⁻¹ e 8 horas de escuro a 26°C e
85% de umidade. As linhagens de tipo selvagem e Δ rcaRCA1
cultivadas a 26°C produziram biomassa total levemente
diminuída e exibiram taxas mais lentas de desenvolvimento
vegetal do que sob condições de crescimento normais,
25 enquanto que a biomassa e o processo de desenvolvimento de
linhagens de Δ rcal83H12 foi inalterado (não apresentado).
Em contraste, o número de siliquas por planta produzido por
plantas Δ rca cultivadas a 26°C foi dramaticamente afetado
pelo polipeptídeo derivado de rubisco ativase que

expressaram (FIG. 6A). As linhagens $\Delta rca183H12$ possuíram de 50 a 100 mais siliquas por planta do que as linhagens $\Delta rcaRCA1$ e 40 a 80 mais siliquas por planta do que as plantas de tipo selvagem. Além disso, as siliquas de $\Delta rca183H12$ foram maiores do que aquelas de plantas de tipo selvagem e das linhagens $\Delta rcaRCA1$ e produziram mais sementes (FIG. 6B). Siliquas de $\Delta rca183H12$ a 26°C exibiram um fenótipo similar às cultivadas de tipo selvagem sob condições de crescimento normais, mas produziram menos sementes. Sob condições de crescimento normais um decréscimo pequeno em peso de semente foi observado em linhagens Δrca expressando $RCA1$ e 183H12 comparado a plantas de tipo selvagem (FIG. 6C; barras brancas). Contudo, sob exposição contínua a 26°C, foi observado em linhagens de $\Delta rca183H12$ um peso de sementes de 50% a 150% maior do que tanto em plantas de tipo selvagem ou linhagens de $\Delta rcaRCA1$. Comparando o peso de sementes para cada linhagem cultivada a 26°C àquele da mesma linhagem cultivada a 22°C, as linhagens $\Delta rca183H12-2$, $\Delta rca183H12-3$ e $\Delta rca183H12-20$ foram surpreendentemente menos afetadas pela maior temperatura de cultivo do que as linhagens $\Delta rcaRCA1$ do tipo selvagem.

Como a exposição a 26°C resultou em siliquas pequenas contendo poucas sementes de pequeno peso de semente, a viabilidade de semente foi analisada usando um teste de germinação. As sementes de plantas de tipo selvagem, $\Delta rcaRCA1-1$ e $\Delta rca183H12-3$ foram coletadas de plantas cultivadas em condições de crescimento normais e 26°C e,

então, germinadas a 22°C. As sementes de linhagens parentais $\Delta rcaRCA1-1$ e $\Delta rca183H12-3$ cultivadas a 22°C, apresentaram a mesma taxa de germinação (86%), que foi levemente menor do que aquela de plantas de tipo selvagem (94%) (FIG. 6C). A inibição completa de germinação (4%) foi observada em sementes $\Delta rcaRCA1-1$ coletadas de pais cultivados a 26°C e inibição significativa nas sementes de tipo selvagem (26%). Conseqüentemente, as sementes $\Delta rca183H12-3$ coletadas de pais cultivados a 26°C exibiram 10 taxas de germinação de 70%, relativamente maiores.

Adicionalmente, plantas foram analisadas para taxas de fotossíntese, taxas de crescimento e produção de sementes sob as seguintes condições de crescimento:

15

Normais: Plantas foram cultivadas sob regime de 16 horas de luz ($225 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8 horas de escuro a 22°C.

20

Temperaturas aumentadas: Plantas foram cultivadas sob condições de crescimento normais por duas semanas e, então, transferidas para a câmara de crescimento e cultivadas sob regime de 16 horas de luz ($225 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8 horas de escuro. Durando o ciclo de luz, a temperatura foi estabelecida em 22°C por seis horas e, então, rapidamente 25 aumentada para 30°C (2°C por minuto) por quatro horas. Após o tratamento de calor, a temperatura foi novamente estabelecida em 22°C.

Temperaturas continuamente aumentadas: Plantas foram cultivadas sob condições de crescimento normais por duas semanas e, então, transferidas à sala de crescimento e cultivadas sob regime de dezesseis horas de luz intensa (300 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e oito horas de escuro. Durante o ciclo luz/escuro, a temperatura foi estabelecida em 26°C e a umidade em 80%.

Os resultados dos testes *in planta* de atividade de polipeptídeo derivado de rubisco ativase nas condições identificadas *supra* são sumarizados abaixo.

Taxas de crescimento. A área foliar foi medida usando um sistema de imagem de fluorescência de clorofila a (FluorImager, Qubit System Inc.). A área foliar observada nas plantas de tipo selvagem não transformadas sob as diferentes condições de crescimento foi estabelecida como 100%. Os dados na Tabela 4 demonstram que plantas expressando qualquer dos três polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase tiveram taxas de crescimento aumentadas sob temperaturas aumentadas, se comparado tanto a plantas de tipo selvagem como plantas expressando uma RuBisCo Ativase de tipo selvagem transgênica.

Taxas de fotossíntese. Plantas foram analisadas para fixação de CO_2 usando o analisador de gás infravermelho portátil (LI6400, Li-Cor) por 15 minutos. A fonte de luz foi estabelecida em 225 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o nível de CO_2 fornecido à folha pelo sistema construído de injeção de CO_2

foi de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os dados na Tabela 5 mostram que plantas expressando qualquer dos três polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase tiveram taxas fotossintéticas aumentadas sob temperaturas aumentadas, se comparado tanto com plantas de tipo selvagem como plantas expressando uma RuBisCo Ativase de tipo selvagem transgênica (ver coluna 3).

Produção de sementes. O peso de semente (mg) foi determinado a partir de plantas secas maduras. A taxa de germinação de sementes foi determinada pelo número de plantas que germinaram na placa MS, suplementada com canamicina. Os dados na Tabela 5 mostram que plantas expressando qualquer dos três polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase tiveram produção de semente aumentada sob temperaturas aumentadas se comparado tanto com plantas de tipo selvagem como plantas expressando uma RuBisCo Ativase de tipo selvagem transgênica (ver coluna 4). A produção de sementes aumentada foi também presente em plantas expressando qualquer dos três polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase sob condições de temperaturas continuamente aumentadas (ver Tabela 6). As taxas de germinação de sementes foram aumentadas sob condições de temperaturas continuamente aumentadas em plantas expressando o polipeptídeo derivado de rubisco ativase 183H12 (SEQ ID NO: 7) se comparado tanto com plantas de tipo selvagem como plantas expressando uma RuBisCo Ativase de tipo selvagem transgênica (ver Tabela 7).

Tabela 1: Tabela de Códon

Aminoácido			Códon						
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cisteína	Cis	C	UGC	UGU					
Ácido Aspártico	Asp	D	GAC	GAU					
Ácido Glutâmico	Glu	E	GAA	GAG					
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU					
Glicina	Gli	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidina	His	H	CAC	CAU					
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lisina	Lis	K	AAA	AAG					
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Metionina	Met	M	AUG						
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Treonina	Tre	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Triptofano	Trp	W	UGG						
Tirosina	Tir	Y	UAC	UAU					

Tabela 2: Efeito de substituição de aminoácidos na atividade e termoestabilidade de RuBisCo Ativase.

Clone	Aminoácido posição								Atividade (3ª bancada) $\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$		Termo-estabilidade *
	42	130	131	168	257	274	293	310	25°C	40°C	(%)
Tipo selvagem (SEQ ID NO:1)	M	M	M	F	V	T	R	K	0,96 ± 0,04	0,634 ± 0,02	66
126H4 (SEQ ID NO:3)		R							0,616 ± 0,04	0,596 ± 0,05	97
182B11 (SEQ ID NO:5)			I						0,426 ± 0,03	0,359 ± 0,01	84
183H12 (SEQ ID NO:7)						R			1,049 ± 0,02	0,857 ± 0,01	82
184B2 (SEQ ID NO:9)								N	1,055 ± 0,03	0,889 ± 0,02	84
079H6 (SEQ ID NO:11)	T		I				K		1,064 ± 0,01	0,940 ± 0,02	88
214A4 (SEQ ID NO:13)	T					R			1,069 ± 0,06	0,986 ± 0,04	92
382D8 (SEQ ID NO:15)			V		I			N	1,012 ± 0,05	0,91 ± 0,06	90
383A12 (SEQ ID NO:17)				L	I	R		N	0,891 ± 0,02	0,920 ± 0,02	103
301C7 (SEQ ID NO:19)				L	I			N	0,905 ± 0,04	0,889 ± 0,01	98
301H3 (SEQ ID NO:21)					I	R		N	0,971 ± 0,05	0,860 ± 0,05	89

* Percentual de Rubisco ativada a 40°C comparado à quantidade de Rubisco ativada a 25°C.

Tabela 3: Atividade relativa (%) de polipeptídeos derivados de RuBisCo Ativase.

Clone	Teste de ativação de Rubisco desativada			Teste de ativação de Rubisco sob condições catalíticas		Teste de ATPase	
	25°C	T.S 45°C / 25°C	T.S 45min a 40°C/ 15min a 25°C	25°C	T.S 40°C/25°C	25°C	T.S 40°C/ 25°C
Tipo selvagem (SEQ ID NO:1)	100	50	32	100	67	100	8
183H12 (SEQ ID NO:7)	109	52	54	118	77	123	28
079H6 (SEQ ID NO:11)	111	63	66	105	82	119	72
214A4 (SEQ ID NO:13)	111	58	65	101	74	124	38
382D8 (SEQ ID NO:15)	105	86	85	98	93	112	113
383A12 (SEQ ID NO:17)	93	92	88	96	97	93	92
301C7 (SEQ ID NO:19)	94	84	92	96	83	105	89
301H3 (SEQ ID NO:21)	101	89	75	92	78	107	112

Tabela 4: Área foliar sob condições de temperaturas normais e aumentadas.

Clone	ID Linhagem	Área foliar (%) *	
		Condições de crescimento normais	Temperaturas
Tipo selvagem	Não transformada	100 ± 13	100 ± 30
Tipo selvagem (SEQ ID NO:1)	RCA1-1	92 ± 26	62 ± 21
	RCA1-8	106 ± 30	48 ± 16
	RCA1-9	88 ± 27	45 ± 23
183H12 (SEQ ID NO:7)	183H12-2	110 ± 25	131 ± 23
	183H12-3	113 ± 17	142 ± 31
	183H12-20	101 ± 30	138 ± 37
382D8 (SEQ ID NO:15)	382D8-1	126 ± 23	151 ± 46
	382D8-2	90 ± 31	81 ± 32
301C7 (SEQ ID NO:19)	301C7-1	105 ± 30	101 ± 19
	301C7-3	104 ± 30	124 ± 31
	301C7-7	116 ± 23	115 ± 36

*A área foliar de *Arabidopsis* de tipo selvagem não transformada foi estabelecida como 100%.

Tabela 5: Taxas de fotossíntese e produção de sementes sob condições de temperaturas normais e aumentadas.

Clone	ID Linhagem	Fotossíntese* ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Produção de sementes # (%)
Tipo selvagem	Não transformada	$7,85 \pm 0,36$	72 ± 14
Tipo selvagem (SEQ ID NO:1)	RCA1-1	$7,25 \pm 1,36$	74 ± 12
183H12 (SEQ ID NO:7)	183H12-3	$9,41 \pm 0,66$	87 ± 8
382D8 (SEQ ID NO:15)	382D8-1	$8,9 \pm 0,93$	100 ± 11
301C7 (SEQ ID NO:19)	301C7-3	$9,03 \pm 0,9$	87 ± 16

*A fotossíntese líquida foi monitorada após 2 horas a 30°C

5 #Percentual de peso de 1000 sementes de plantas cultivadas sob temperaturas aumentadas, comparado com o peso de 1000 sementes de plantas cultivadas sob condições normais.

Tabela 6: Produção de sementes sob condições de temperaturas normais e continuamente aumentadas.

Clone	ID Linhagem	Peso (mg) de 1000 sementes	
		Condições de crescimento normais	Temperaturas continuamente aumentadas
Tipo selvagem	Não transformada	28,900 ± 4,140	9,484 ± 1,971
Tipo selvagem (SEQ ID NO:1)	RCA1-1	25,837 ± 2,721	8,501 ± 1,921
	RCA1-8	21,880 ± 2,839	10,529 ± 0,830
	RCA1-9	22,846 ± 1,714	9,861 ± 0,596
183H12 (SEQ ID NO:7)	183H12-2	19,773 ± 2,112	15,858 ± 3,249
	183H12-3	25,934 ± 1,869	24,812 ± 1,376
	183H12-20	21,730 ± 2,284	14,955 ± 2,996

Tabela 7: Taxas de germinação de sementes colhidas de plantas cultivadas sob condições de temperaturas normais e continuamente aumentadas.

Clone	ID Linhagem	Sementes germinadas (%)	
		Condições de crescimento normais	Temperaturas continuamente aumentadas
Tipo selvagem	Não transformada	94 ± 2	26 ± 6
Tipo selvagem (SEQ ID NO:1)	RCA1-1	82 ± 6	4 ± 4
183H12 (SEQ ID NO:7)	183H12-3	82 ± 2	70 ± 10

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, PLANTA TRANSGÊNICA E MÉTODO DE AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO CALOR EM PLANTAS

<130> Referência do Documento: V0136-PCT

<150> No. do Pedido de Prioridade: 60/711,449

<151> Data de depósito do Pedido de Prioridade: 24-08-2005

<160> Quantidade de SEQ ID Nos.: 26

<170> Software: FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> SEQ ID No 1

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 1

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caaggttcca 300
cttattttgg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaat ccttccagtg tgagcttgctc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtgtctg gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcactggtaa cgatttctcc accctatacg ctctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcgggtg ctgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cactgttgga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cgggtctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaag atcgggaaaga ggctgggttaa ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgatg tggacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 2

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 2

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
1           5           10           15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
20           25           30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
35           40           45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr

```

50	55	60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met		
65	70	75
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn		80
	85	90
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly		95
	100	105
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro		110
	115	120
Ile Met Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro		125
	130	135
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys		140
145	150	155
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala		160
	165	170
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val		175
	180	185
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu		190
	195	200
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys		205
	210	215
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly		220
225	230	235
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly		240
	245	250
Val Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile		255
	260	265
Val Thr Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly		270
	275	280
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu		285
	290	295
Ser Leu Gly Val Glu Lys Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu		300
305	310	315
Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met		320
	325	330
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val		335
	340	345
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn		350
	355	360
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys		365
	370	375
Glu Pro Ser Lys Leu Glu		380
385	390	

<210> SEQ ID No 3

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 3

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttggg caacatgatg gatggggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacaat caaggttcca 300
cttattttgg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaata ccttccagtg tgagcttgctc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcagg atgagtgctg gagagcttga gagtggaaac 420

```

```

gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctgggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atgggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcactggtaa cgatttctcc accctatacg ctccctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agtttactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcggtgt ctgcaagggg 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cgggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttg agttgagaag atcggaaaga ggctgggtta ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgatg tggaacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 4

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 4

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
 1          5          10          15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
          20          25          30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
          35          40          45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
          50          55          60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
65          70          75          80
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
          85          90          95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
          100          105          110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
          115          120          125
Ile Arg Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
130          135          140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
145          150          155          160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
          165          170          175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
          180          185          190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
          195          200          205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
210          215          220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
225          230          235          240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
          245          250          255
Val Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
          260          265          270
Val Thr Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
          275          280          285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
290          295          300

```

```

Ser Leu Gly Val Glu Lys Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
305                      310                      315                      320
Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
                      325                      330                      335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
                      340                      345                      350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
                      355                      360                      365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
                      370                      375                      380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
385                      390

```

<210> SEQ ID No 5
 <211> Comprimento: 1173
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 5

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgata aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caagggtcca 300
cttatttttg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaata ccttccagtg tgagcttgtc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg ataagtgtct gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcaactgtaa cgattttctc accctatacg ctctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcggtgt ctgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttg agttgagaag atcggaaaga ggctggttaa ctcaagggaa 960
ggacctcccg tggtcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgatg tggacaaga gaattgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagcccag caagctcgag taa
1173

```

<210> SEQ ID No 6
 <211> Comprimento: 390
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 6

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
1          5          10          15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
20          25          30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
35          40          45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
50          55          60

```

```

Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
65                               70                               75                               80
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
85                               90                               95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
100                             105                             110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
115                             120                             125
Ile Met Ile Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
130                             135                             140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
145                             150                             155                             160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
165                             170                             175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
180                             185                             190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
195                             200                             205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
210                             215                             220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
225                             230                             235                             240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
245                             250                             255
Val Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
260                             265                             270
Val Thr Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
275                             280                             285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
290                             295                             300
Ser Leu Gly Val Glu Lys Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
305                             310                             315                             320
Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
325                             330                             335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
340                             345                             350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
355                             360                             365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
370                             375                             380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
385                             390

```

<210> SEQ ID No 7

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 7

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgct cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caaggttcca 300
cttatttttg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaatt ccttccagtg tgagcttgct 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtgtg gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga tttgatcaag 480

```

```

aagggaaaga tgtgtgtgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atgggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcaactggtta cgattttctcc accctatacg ctccctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcggtgt ctgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca gacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cgggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaag atcggaaaga ggctgggtta ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgtga tggaacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctc tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 8

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 8

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
 1           5           10           15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
          20           25           30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
          35           40           45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
          50           55           60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
65           70           75           80
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
          85           90           95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
          100          105          110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
          115          120          125
Ile Met Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
          130          135          140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
145          150          155          160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
          165          170          175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
          180          185          190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
          195          200          205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
          210          215          220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
225          230          235          240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
          245          250          255
Val Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
          260          265          270
Val Arg Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
          275          280          285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
          290          295          300
Ser Leu Gly Val Glu Lys Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu

```

```

305          310          315          320
Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
          325          330          335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
          340          345          350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
          355          360          365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
          370          375          380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
385          390

```

<210> SEQ ID No 9

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 9

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggatagg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgccatacat caagggtcca 300
cttatttttg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaat ccttccagtg tgagcttgtc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtgtct gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatggga 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcactggtaa cgatttctcc accctatacg ctccctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agtttctact ggccccgacc cgtgaagacc gtatcgggtg ctgcaagggg 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaat atcggaaaga ggctgggtta ctcaagggaa 960
ggacctcccg tggtcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttggtg tggacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgtgcac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagcccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 10

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 10

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
1          5          10          15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
20          25          30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
35          40          45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
50          55          60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met

```

65					70					75				80
Asp	Lys	Leu	Val	Val	His	Ile	Thr	Lys	Asn	Phe	Leu	Thr	Leu	Pro Asn
				85					90					95
Ile	Lys	Val	Pro	Leu	Ile	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Gly	Lys	Gly	Gln Gly
			100					105					110	
Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	Glu	Leu	Val	Met	Ala	Lys	Met	Gly	Ile	Asn Pro
		115						120				125		
Ile	Met	Met	Ser	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu Pro
	130						135				140			
Ala	Lys	Leu	Ile	Arg	Gln	Arg	Tyr	Arg	Glu	Ala	Ala	Asp	Leu	Ile Lys
145					150					155				160
Lys	Gly	Lys	Met	Cys	Cys	Leu	Phe	Ile	Asn	Asp	Leu	Asp	Ala	Gly Ala
				165					170					175
Gly	Arg	Met	Gly	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Thr	Val	Asn	Asn	Gln	Met Val
		180						185					190	
Asn	Ala	Thr	Leu	Met	Asn	Ile	Ala	Asp	Asn	Pro	Thr	Asn	Val	Gln Leu
	195						200					205		
Pro	Gly	Met	Tyr	Asn	Lys	Glu	Asn	Ala	Arg	Val	Pro	Ile	Ile	Cys
	210				215					220				
Thr	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Pro	Leu	Ile	Arg	Asp Gly
225				230						235				240
Arg	Met	Glu	Lys	Phe	Tyr	Trp	Ala	Pro	Thr	Arg	Glu	Asp	Arg	Ile Gly
				245					250					255
Val	Cys	Lys	Gly	Ile	Phe	Arg	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp Ile
			260					265					270	
Val	Thr	Leu	Val	Asp	Gln	Phe	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Asp	Phe	Phe Gly
	275						280					285		
Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	Val	Tyr	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Phe	Val Glu
	290					295					300			
Ser	Leu	Gly	Val	Glu	Asn	Ile	Gly	Lys	Arg	Leu	Val	Asn	Ser	Arg Glu
305					310					315				320
Gly	Pro	Pro	Val	Phe	Glu	Gln	Pro	Glu	Met	Thr	Tyr	Glu	Lys	Leu Met
				325					330					335
Glu	Tyr	Gly	Asn	Met	Leu	Val	Met	Glu	Gln	Glu	Asn	Val	Lys	Arg Val
			340					345					350	
Gln	Leu	Ala	Glu	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Asp	Ala Asn
	355						360					365		
Ala	Asp	Ala	Ile	Gly	Arg	Gly	Thr	Phe	Tyr	Gly	Lys	Thr	Glu	Glu Lys
	370					375					380			
Glu	Pro	Ser	Lys	Leu	Glu									
385					390									

<210> SEQ ID No 11

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 11

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctacgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatggggttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caagggttcca 300
cttatatttg gtatatgggg aggcaaagg caaggtaaat ccttccagtg tgagcttgct 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg ataagtgctg gagagcttga gagtggaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540

```

```

ggtactactc agtacactgt caacaaccag atgggtaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccacatatt gcaactggtaa cgatttctcc accctatacg ctcctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agtttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcggtgt ctgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cgggtgctttg agggcgaaaag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaag atcggaaaga ggctgggttaa ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgctcgtga tggaacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 12

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 12

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
 1           5           10           15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
      20           25           30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Thr Gly Thr Gly Thr His His
      35           40           45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
      50           55           60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
      65           70           75           80
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
      85           90           95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
      100          105          110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
      115          120          125
Ile Met Ile Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
      130          135          140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
      145          150          155          160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
      165          170          175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
      180          185          190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
      195          200          205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
      210          215          220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
      225          230          235          240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
      245          250          255
Val Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
      260          265          270
Val Thr Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
      275          280          285
Ala Leu Arg Ala Lys Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
      290          295          300
Ser Leu Gly Val Glu Lys Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
      305          310          315          320

```

```

Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
      325      330      335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
      340      345      350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
      355      360      365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
      370      375      380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
385      390

```

<210> SEQ ID No 13

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 13

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctacgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caaggttcca 300
cttatttttg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaata ccttccagtg tgagcttgctc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtgtct gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga tttgatcaag 480
aagggaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gactggtaa cgatttctcc accctatacg ctctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcgggtg ctgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca gacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaag atcggaaaga ggctgggtta ctcaagggaa 960
ggacctcccg tggtcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgctcgtga tggaacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgtgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagcccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 14

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 14

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
  1      5      10      15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
  20      25      30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Thr Gly Thr Gly Thr His His
  35      40      45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
  50      55      60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
  65      70      75      80

```

Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
 85 90 95
 Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
 100 105 110
 Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
 115 120 125
 Ile Met Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
 130 135 140
 Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
 145 150 155 160
 Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
 165 170 175
 Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
 180 185 190
 Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
 195 200 205
 Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
 210 215 220
 Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
 245 250 255
 Val Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
 260 265 270
 Val Arg Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
 275 280 285
 Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
 290 295 300
 Ser Leu Gly Val Glu Lys Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
 305 310 315 320
 Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
 325 330 335
 Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
 340 345 350
 Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
 355 360 365
 Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
 370 375 380
 Glu Pro Ser Lys Leu Glu
 385 390

<210> SEQ ID No 15

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 15

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
 tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
 cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
 cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
 gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caaggttcca 300
 cttattttgg gtatatgggg aggcaaaggc caaggtaaat ccttccagtg tgagcttgctc 360
 atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg gtgagtgtg gagagcttga gagtggaaac 420
 gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga tttgatcaag 480
 aagggaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctgggtgcggg tcgtatgggt 540
 ggtactactc agtacactgt caacaaccag atgggttaacg caacactcat gaacattgct 600

```

gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcactggtaa cgattttctcc accctatacg ctctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcgggtat atgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cacttggtga tcagttccct 840
gggtcaatcta tcgatttctt cgggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaat atcggaaaga ggctgggttaa ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgtga tggacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 16

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 16

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
1          5          10          15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
20          25          30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
35          40          45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
50          55          60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
65          70          75          80
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
85          90          95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
100         105         110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
115         120         125
Ile Met Val Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
130         135         140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
145         150         155         160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
165         170         175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
180         185         190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
195         200         205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
210         215         220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
225         230         235         240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
245         250         255
Ile Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
260         265         270
Val Thr Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
275         280         285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
290         295         300
Ser Leu Gly Val Glu Asn Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
305         310         315         320

```

Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
 325 330 335
 Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
 340 345 350
 Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
 355 360 365
 Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
 370 375 380
 Glu Pro Ser Lys Leu Glu
 385 390

<210> SEQ ID No 17

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 17

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgatgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggatatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caagggtcca 300
cttatttttg gtatatgggg aggc aaagggt caaggtaaat ccttccagtg tgagcttgctc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtgtctg gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaaga tgtgttgtct cctcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atgggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcactggtaa cgatttctcc accctatacg ctccctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcggtat atgcaagggg 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca gacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaat atcggaaga ggctgggtta ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgatg tggacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctc tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagcccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 18

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 18

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
 20 25 30
 Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
 35 40 45
 Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
 50 55 60
 Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
 65 70 75 80

```

Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
      85                      90                      95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
      100                    105                    110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
      115                    120                    125
Ile Met Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
      130                    135                    140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
      145                    150                    155                    160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Leu Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
      165                    170                    175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
      180                    185                    190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
      195                    200                    205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
      210                    215                    220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
      225                    230                    235                    240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
      245                    250                    255
Ile Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
      260                    265                    270
Val Arg Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
      275                    280                    285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
      290                    295                    300
Ser Leu Gly Val Glu Asn Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
      305                    310                    315                    320
Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
      325                    330                    335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
      340                    345                    350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
      355                    360                    365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
      370                    375                    380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
      385                    390

```

<210> SEQ ID No 19

<211> Comprimento: 1173

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 19

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgacgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgctaacaat caaggttcca 300
cttattttgg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaat ccttcagtg tgagcttgct 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtctg gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaga tgtgttgtct cctcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atggttaacg caacactcat gaacattgct 600

```

```

gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccattcattt gcactggtaa cgatttctcc accctatacg ctctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agtttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcgggat atgcaagggt 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca cacttggtga tcagttccct 840
ggccaatcta tcgatttctt cgggtgctttg agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttgg agttgagaat atcggaaaga ggctgggttaa ctcaagggaa 960
ggacctcccg tgttcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgctcgtga tggacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgctt tgggagacgc aaacgctgac gccatcggcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagcccg caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 20

<211> Comprimento: 390

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 20

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
1          5          10          15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
20          25          30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
35          40          45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
50          55          60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
65          70          75          80
Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
85          90          95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
100         105         110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
115         120         125
Ile Met Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
130         135         140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
145         150         155         160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Leu Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
165         170         175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
180         185         190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
195         200         205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
210         215         220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
225         230         235         240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
245         250         255
Ile Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
260         265         270
Val Thr Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
275         280         285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
290         295         300
Ser Leu Gly Val Glu Asn Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
305         310         315         320

```

```

Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
      325                      330                      335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
      340                      345                      350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
      355                      360                      365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
      370                      375                      380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
385                      390

```

<210> SEQ ID No 21
 <211> Comprimento: 1173
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 21

```

atggtgaaag aagacaaaca aaccgacgga gacagatgga gaggtcttgc ctacgacact 60
tctgatgatc aacaagacat caccagaggc aagggtatgg ttgactctgt cttccaagct 120
cctatgggaa ccggaactca ccacgctgtc cttagctcat acgaatacgt tagccaaggc 180
cttaggcagt acaacttgga caacatgatg gatgggtttt acattgctcc tgctttcatg 240
gacaagcttg ttgttcacat caccaagaac ttcttgactc tgcctaacat caaggttcca 300
cttatttttg gtatatgggg aggcaaaggt caaggtaaatt ccttccagtg tgagcttggtc 360
atggccaaga tgggtatcaa cccaatcatg atgagtgtcg gagagcttga gagtggaaac 420
gcaggagaac ccgcaaagct tatccgtcag aggtaccgtg aggcagctga cttgatcaag 480
aagggaaga tgtgttgtct cttcatcaac gatcttgacg ctggtgcggg tcgtatgggt 540
ggtactactc agtacactgt caacaaccag atggttaacg caacactcat gaacattgct 600
gataacccaa ccaacgtcca gctcccagga atgtacaaca aggaagagaa cgcacgtgtc 660
cccatcattt gcactggtaa cgatttctcc accctatacg ctctctcat ccgtgatgga 720
cgtatggaga agttctactg ggccccgacc cgtgaagacc gtatcggtat atgcaagggg 780
atcttcagaa ctgacaagat caaggacgaa gacattgtca gacttggtga tcagttccct 840
ggtcaatcta tcgatttctt cgggtgcttt agggcgagag tgtacgatga tgaagtgagg 900
aagttcgttg agagccttg agttgagaat atcggaaaga ggctgggtta ctcaagggaa 960
ggaccccccg tggtcgagca acccgagatg acttatgaga agcttatgga atacggaaac 1020
atgcttgatg tggaacaaga gaatgtcaag agagtccaac ttgccgagac ctacctcagc 1080
caggctgtc tgaggagcgc aaacgctgac gccatcgcc gcggaacttt ctacggtaaa 1140
acagaggaaa aggagccag caagctcgag taa 1173

```

<210> SEQ ID No 22
 <211> Comprimento: 390
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Baseada na sequência de Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 22

```

Met Val Lys Glu Asp Lys Gln Thr Asp Gly Asp Arg Trp Arg Gly Leu
  1          5          10          15
Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Asp Gln Gln Asp Ile Thr Arg Gly Lys Gly
      20          25          30
Met Val Asp Ser Val Phe Gln Ala Pro Met Gly Thr Gly Thr His His
      35          40          45
Ala Val Leu Ser Ser Tyr Glu Tyr Val Ser Gln Gly Leu Arg Gln Tyr
      50          55          60
Asn Leu Asp Asn Met Met Asp Gly Phe Tyr Ile Ala Pro Ala Phe Met
65          70          75          80

```

```

Asp Lys Leu Val Val His Ile Thr Lys Asn Phe Leu Thr Leu Pro Asn
      85          90          95
Ile Lys Val Pro Leu Ile Leu Gly Ile Trp Gly Gly Lys Gly Gln Gly
      100        105        110
Lys Ser Phe Gln Cys Glu Leu Val Met Ala Lys Met Gly Ile Asn Pro
      115        120        125
Ile Met Met Ser Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Pro
      130        135        140
Ala Lys Leu Ile Arg Gln Arg Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys
      145        150        155        160
Lys Gly Lys Met Cys Cys Leu Phe Ile Asn Asp Leu Asp Ala Gly Ala
      165        170        175
Gly Arg Met Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Thr Val Asn Asn Gln Met Val
      180        185        190
Asn Ala Thr Leu Met Asn Ile Ala Asp Asn Pro Thr Asn Val Gln Leu
      195        200        205
Pro Gly Met Tyr Asn Lys Glu Glu Asn Ala Arg Val Pro Ile Ile Cys
      210        215        220
Thr Gly Asn Asp Phe Ser Thr Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Arg Asp Gly
      225        230        235        240
Arg Met Glu Lys Phe Tyr Trp Ala Pro Thr Arg Glu Asp Arg Ile Gly
      245        250        255
Ile Cys Lys Gly Ile Phe Arg Thr Asp Lys Ile Lys Asp Glu Asp Ile
      260        265        270
Val Arg Leu Val Asp Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ile Asp Phe Phe Gly
      275        280        285
Ala Leu Arg Ala Arg Val Tyr Asp Asp Glu Val Arg Lys Phe Val Glu
      290        295        300
Ser Leu Gly Val Glu Asn Ile Gly Lys Arg Leu Val Asn Ser Arg Glu
      305        310        315        320
Gly Pro Pro Val Phe Glu Gln Pro Glu Met Thr Tyr Glu Lys Leu Met
      325        330        335
Glu Tyr Gly Asn Met Leu Val Met Glu Gln Glu Asn Val Lys Arg Val
      340        345        350
Gln Leu Ala Glu Thr Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Leu Gly Asp Ala Asn
      355        360        365
Ala Asp Ala Ile Gly Arg Gly Thr Phe Tyr Gly Lys Thr Glu Glu Lys
      370        375        380
Glu Pro Ser Lys Leu Glu
      385        390

```

<210> SEQ ID No 23
 <211> Comprimento: 17
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: primer

<400> Sequência: 23
 cagacaatgt tggcctc

<210> SEQ ID No 24
<211> Comprimento: 18
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: primer

<400> Sequência: 24
acgagtaacg atggtagg

18

<210> SEQ ID No 25
<211> Comprimento: 15
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: primer

<400> Sequência: 25
gtctatacct tgagc

15

<210> SEQ ID No 26
<211> Comprimento: 14
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: primer

<400> Sequência: 26
tcagtcatac tcgg

14

**REIVINDICAÇÕES**

1. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5,
5 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 ou um complemento das mesmas.

2. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de que é selecionada do grupo consistindo de:

10 a. molécula de ácido nucléico compreendendo uma sequência de nucleotídeos, a qual é pelo menos 95% idêntica à sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 ou um complemento das mesmas;

15 b. molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22; e

20 c. molécula de ácido nucléico que hibridiza, sob condições severas, com uma sonda de ácido nucléico consistindo da sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11,
25 13, 15, 17, 19 e 21 ou um complemento das mesmas.

3. Molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a molécula de ácido nucléico codifica um polipeptídeo com

termoestabilidade aumentada, quando comparado com um polipeptídeo da SEQ ID NO: 2.

4. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico como definida na reivindicação 1
5 ou 2.

5. Vetor de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é um vetor de expressão.

10 6. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido na reivindicação 4.

7. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12,
15 14, 16, 18, 20 e 22.

8. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo consistindo de:

20 a. polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntico à sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22;

25 b. polipeptídeo que é codificado por uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma sequência de nucleotídeos, a qual é pelo menos 95% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 ou um complemento das mesmas;

c. polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico que hibridiza, sob condições severas, com uma sonda de ácido nucléico consistindo da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 ou um complemento das mesmas.

9. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo apresenta termoestabilidade aumentada, quando comparado com um polipeptídeo da SEQ ID NO: 2.

10. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende um transgênie que expressa:

a. o polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22; ou

b. a molécula de ácido nucléico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21.

11. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a planta é selecionada do grupo consistindo de plantas de milho, tomate, batata, arroz, soja, algodão, girassol, alfalfa, alface, canola, sorgo ou tabaco.

12. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a planta transgênica

apresenta tolerância ao calor aumentada, quando comparada a uma planta que não é transgênica.

13. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de que
5 compreende um transgênie que expressa:

c. o polipeptídeo como definido na reivindicação 8
ou

10 d. a molécula de ácido nucléico como definida na
reivindicação 2.

14. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13,
caracterizada pelo fato de que a planta é selecionada do
15 grupo consistindo de plantas de milho, tomate, batata,
arroz, soja, algodão, girassol, alfalfa, alface, canola,
sorgo ou tabaco.

15. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13,
20 caracterizada pelo fato de que a planta transgênica
apresenta tolerância ao calor aumentada, quando comparada a
uma planta que não é transgênica.

16. Método de aumento da tolerância ao calor em plantas,
25 caracterizado pelo fato de que compreende expressar um
polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10,
12, 14, 16, 18, 20 e 22 em uma planta.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é expresso no um ou mais plastídeos da planta.

5 18. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a expressão do referido polipeptídeo resulta em um aumento na taxa de fotossíntese, sob condições aquecidas.

10 19. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a expressão ou a atividade da RuBisCO activase endógena da planta é regulada negativamente.

15 20. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a expressão ou a atividade da RuBisCO activase endógena da planta é eliminada.

FIGURA 1

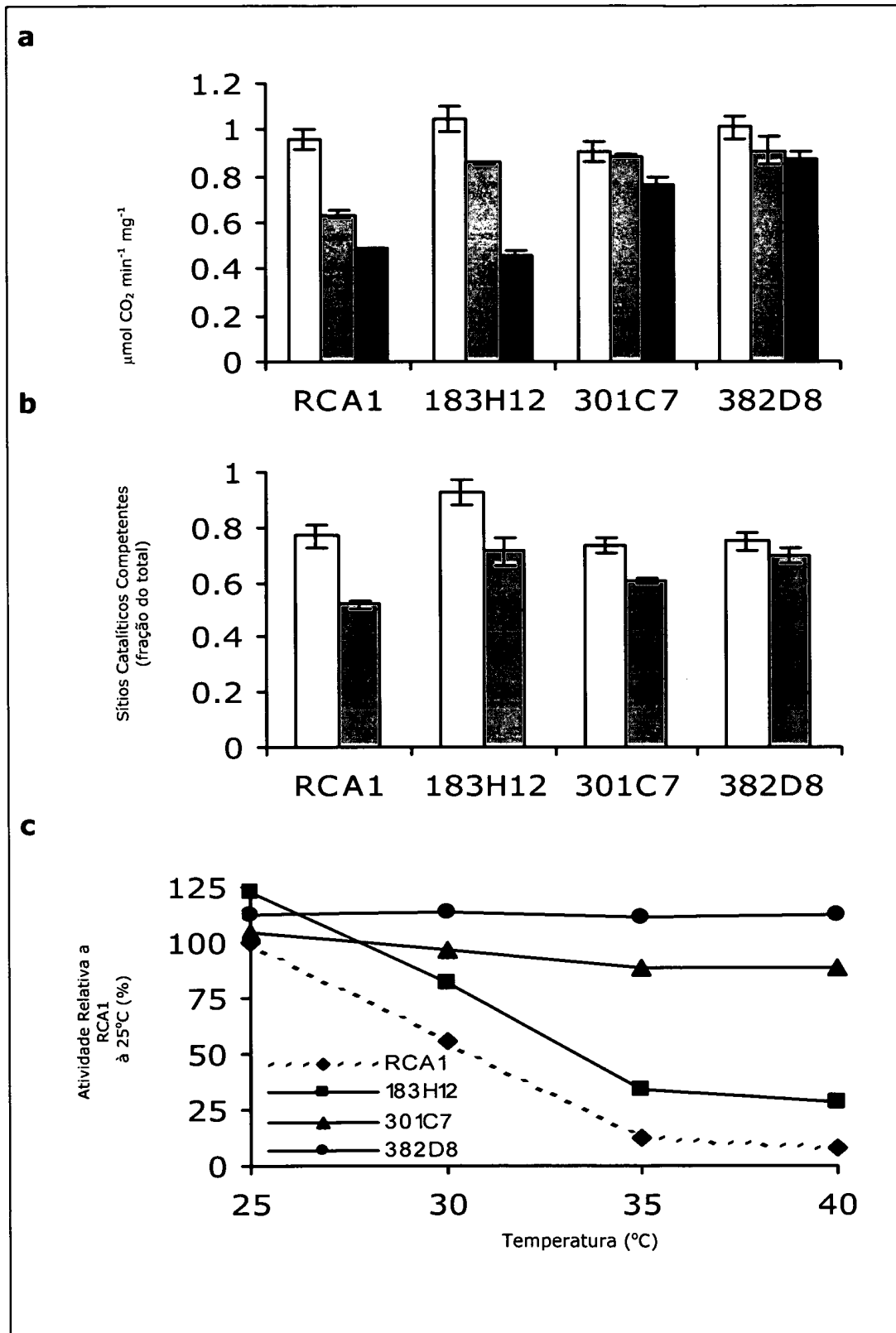


FIGURA 2

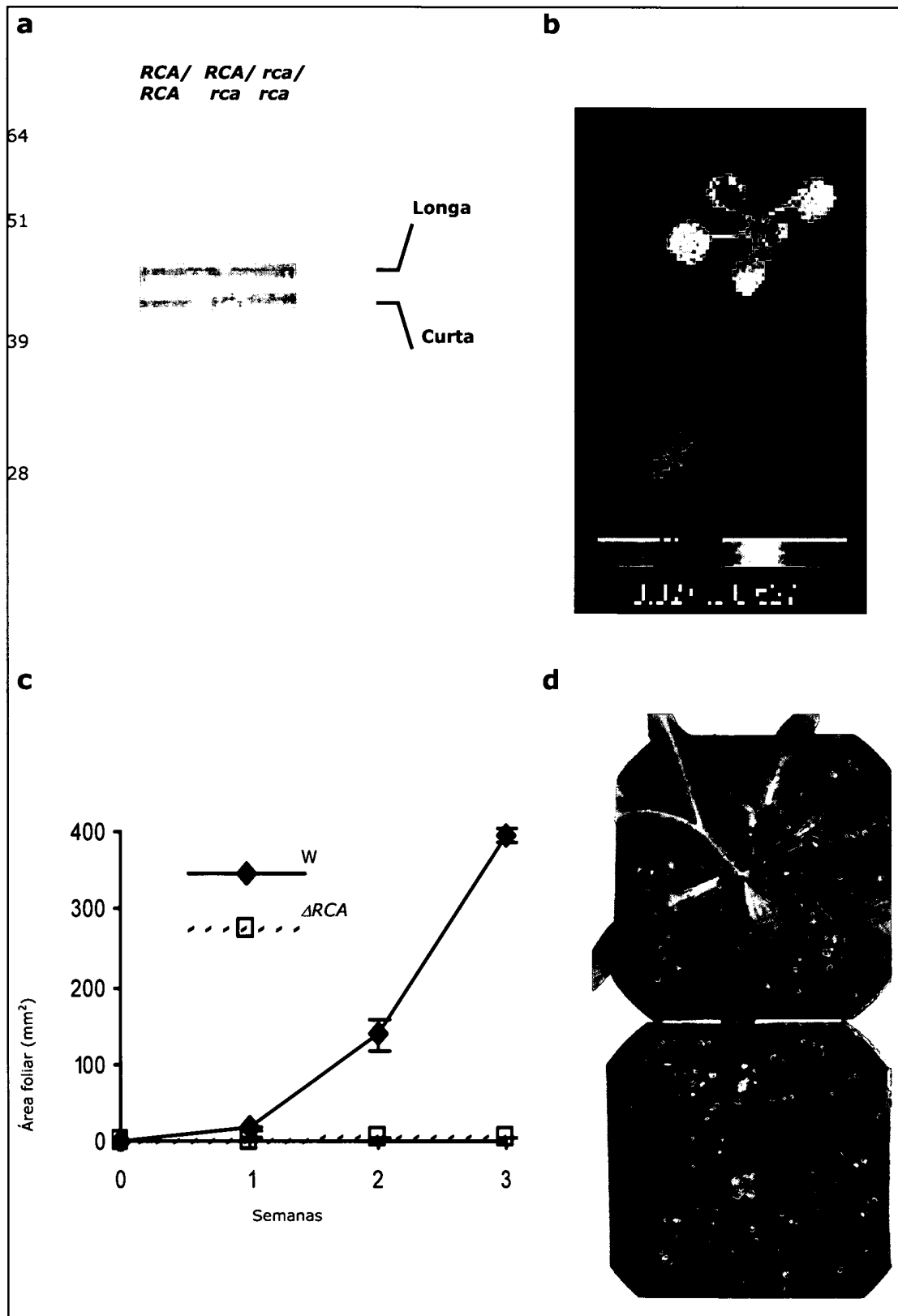


FIGURA 3

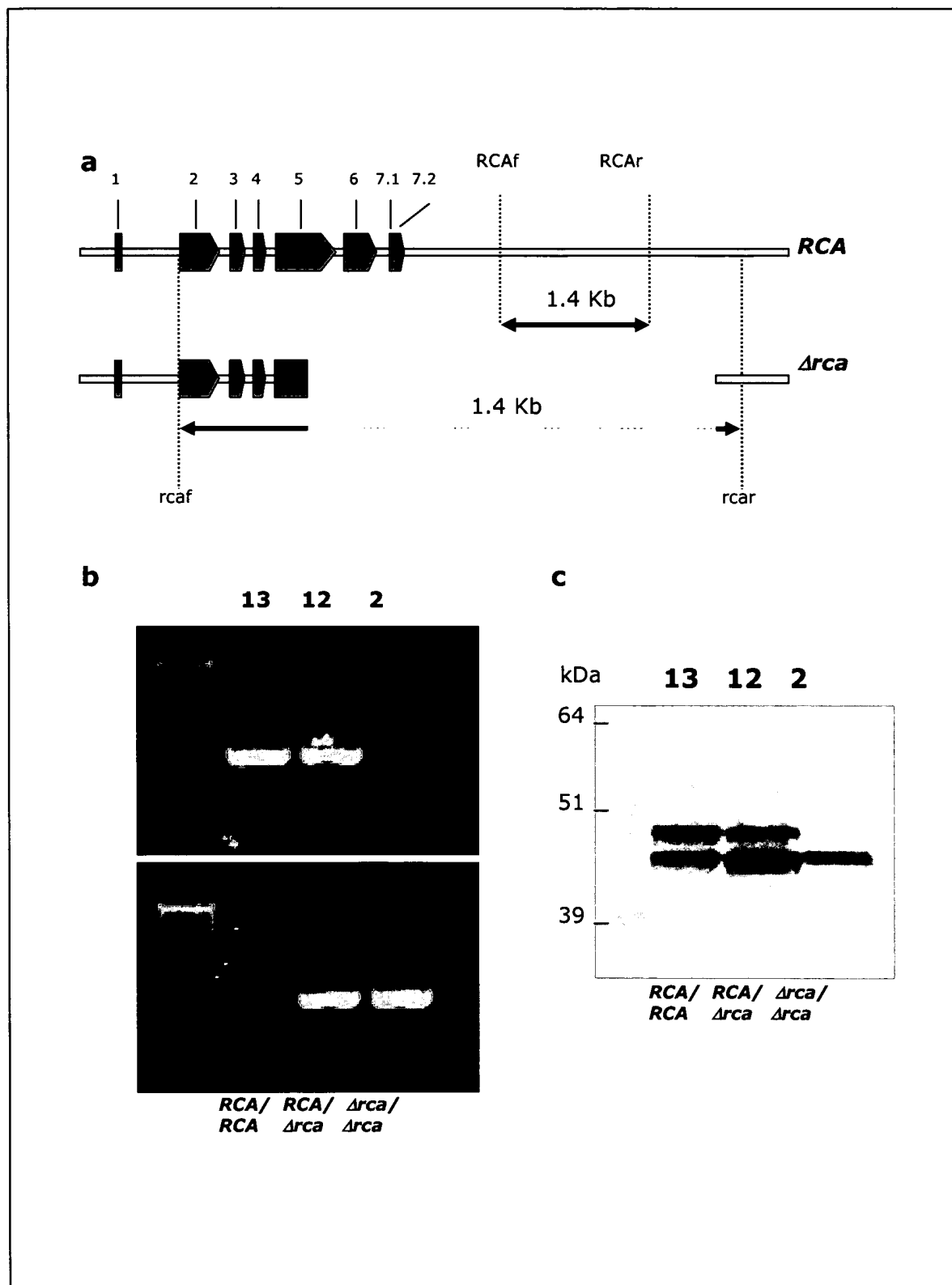


FIGURA 4

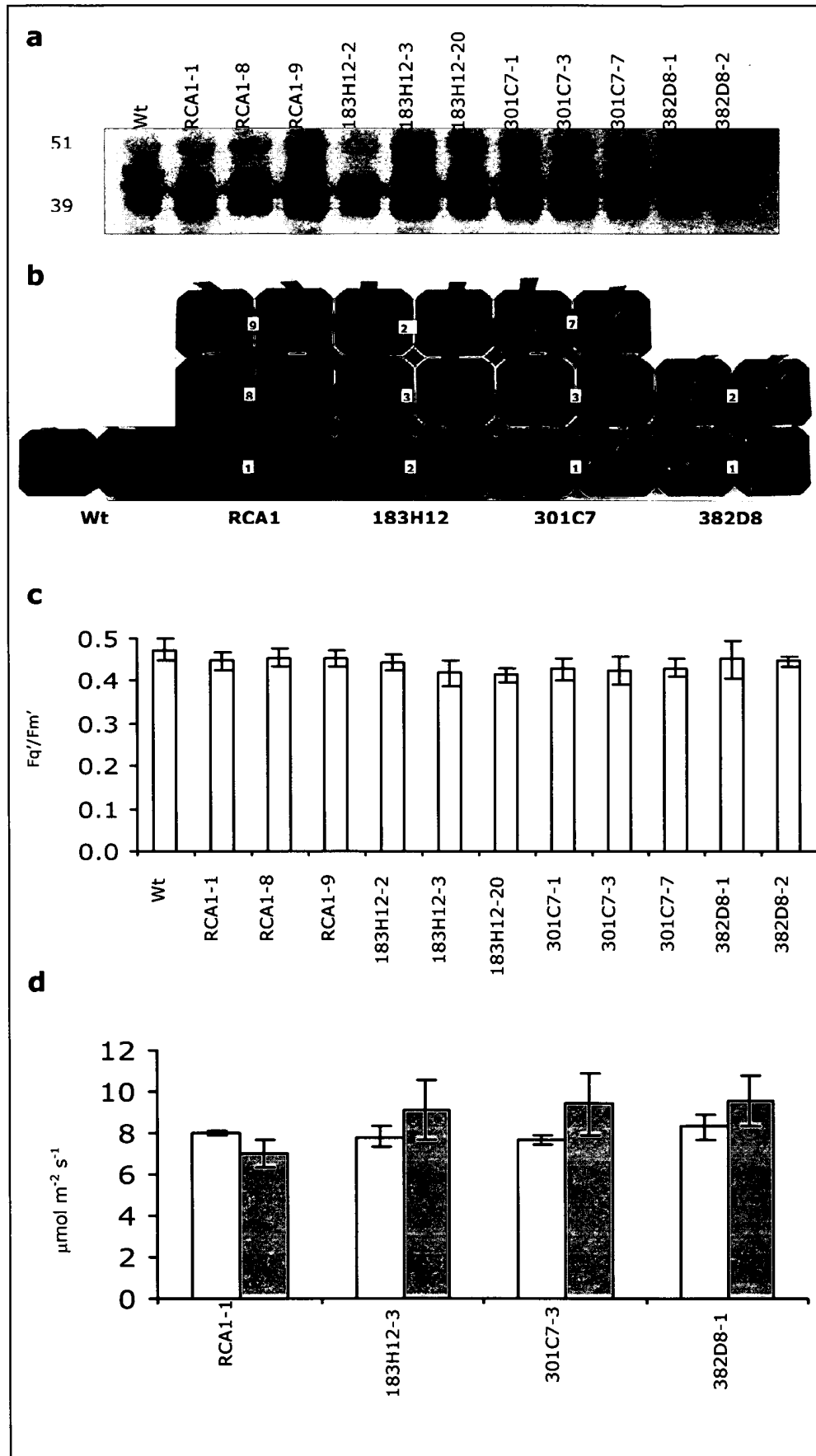


FIGURA 5

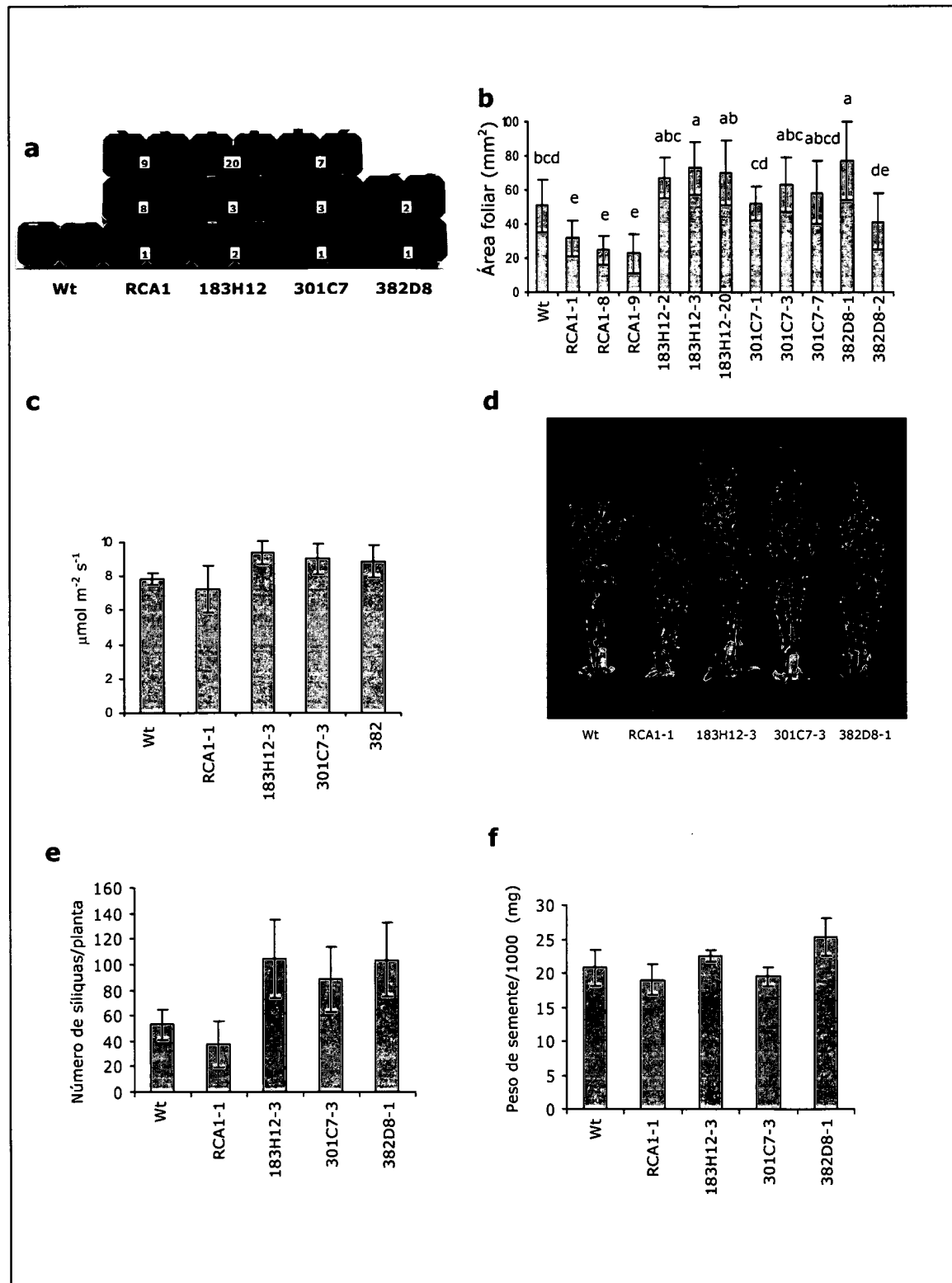
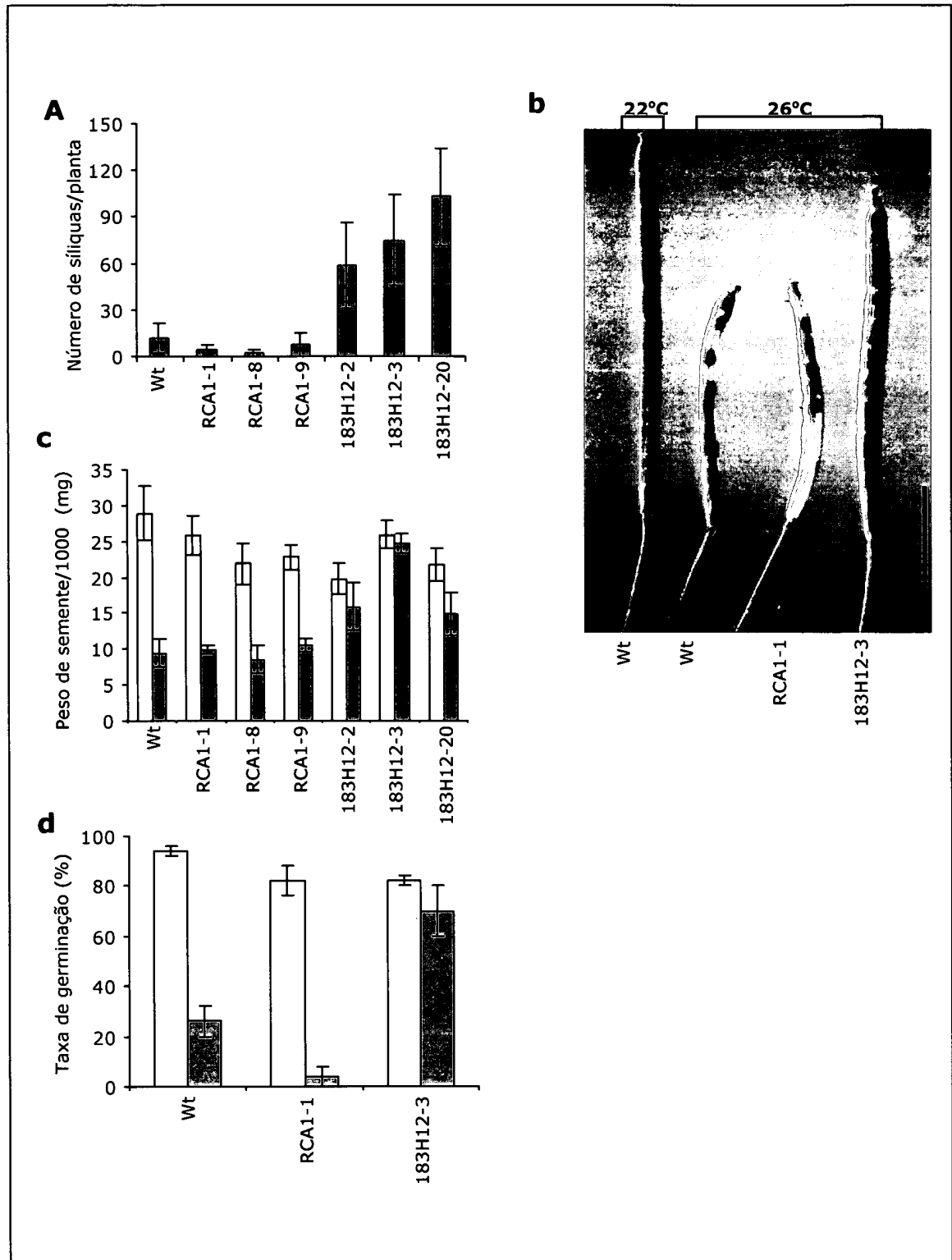


FIGURA 6



RESUMO

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, PLANTA TRANSGÊNICA E MÉTODO DE AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO CALOR EM PLANTAS

5

A presente invenção provê polipeptídeos termoestáveis relacionados com os polipetídeos de RuBisCO activase de Arabidopsis.

10

A presente invenção refere-se ainda a ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção.

15

São também objetos da presente invenção os métodos de utilização dos polipeptídeos e ácidos nucleicos da invenção, para aumentar a resistência de plantas aos problemas causados pelo calor.