



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

(21) PI 1105303-8 A2



* B R P I 1 1 0 5 3 0 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 22/12/2011
(43) Data da Publicação: 22/04/2014
(RPI 2259)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/29
C12N 15/52
C12N 15/82
A01H 4/00

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO DE CANA-DE-AÇÚCAR QUE CONFERE TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

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

(72) Inventor(es): ANDREA AKEMI HOSHINO, CESAR BUENO DE SOUZA, GLAUCIA MENDES DE SOUZA, MARCELO MENOSSEI TEIXEIRA, ÉDER BEDANI RUIS CHAGAS

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO DE CANA-DE-AÇÚCAR QUE CONFERE TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS As plantas são influenciadas por um grande número de fatores ambientais bióticos e abióticos e recorrentemente estresses abióticos são mais graves, afetando todas as funções da planta, resultando em redução do crescimento e da produtividade. Nesse sentido, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância abióticos são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares tolerantes à seca. Dessa forma, a presente invenção descreve um método de produção de plantas que contém em suas células uma sequência de nucleotídeos de cana-de-açúcar. A expressão do vetor que contém a sequência poderá levar a planta na qual ele é inserido à maior tolerância a estresses abióticos. De uma forma mais ampla, é descrito um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de cana-de-açúcar, o qual é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas e este polinucleotídeo confere tolerância a diferentes estresses abióticos.

```
1 CGGCGATCGC GACCGAGTTC CTGCTGCTCA TGGTGGCGCT GGACAAGCTC
M V A L D K L
51 TACTTTACGC CCCTGGGCAA GTTCATGGAC GAGCGGGACG CCAAGATCCG
Y F T P L G K F M D E R D A K I R
101 CGGCGAGCTC GCGGACGTCA AGGACGCTC CGAGGAGGTG AAGCAGCTGG
G E L G D V K D A S E E V K Q L E
151 AGGAGCAGGC GGTGCGCATC ATGAAGGCGG CGCGCGCCGA GATCGCGCGG
E Q A V A I M K A A R A E I A A
201 GCGCTCAACA AGATGAAGAA GGAGACCACC GCGGAGCTGG AGGCCAAGCT
A L N K M K K E T T A E L E A K L
251 GGAGGAGGGC GCGAGCCCGG TGGAGGCCGA GCTCGTCGAG GCGCTCGCCA
E E G R S R V E A E L V E A L A N
301 ACCTCGAGGC GCAGAAAGAG GAGGCCGTCA AGGCGCTCGA CGCGCAGATC
L E A Q K E E A V K A L D A Q I
351 GCCTCGCTCA GCGATGAGAT CGTCAAGAAG GTGCTCCCAT CCGCCTGAGG
A S L S D E I V K K V L P S A *
401 AAACCAACC AGCGAGCCGG CCGGGCCGGT GGGCGTTCCT TAGCTTTTCT
451 GATCAGTGTG TATACGCTGG TCGGGCTGCC GT
```

POLINUCLEOTÍDEO DE CANA-DE-AÇÚCAR QUE CONFERE TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

CAMPO DA INVENÇÃO

As plantas são influenciadas por um grande número de fatores ambientais e recorrentemente estresses abióticos como seca, salinidade, temperatura, e radiação, são mais graves e afetam todas as funções da planta, resultando em redução do crescimento e da produtividade. Estima-se que esse tipo de estresse reduza a produtividade em 50% e em alguns casos até 70%. Isso tem levado a esforços para a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância a estresses abióticos, visando o desenvolvimento de novas cultivares mais tolerantes. Dessa forma, a presente invenção descreve um método para produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais graças à introdução de um vetor que contém sequência de um polinucleotídeo de cana-de-açúcar que codifica um polipeptídeo com alta identidade com subunidade β de ATP sintases, além da construção de vetor e seus usos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

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

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

Nos últimos anos tem-se obtido grande avanço nas tecnologias para a transformação de plantas e as pesquisas têm se voltado para a necessidade de desenvolver eficazes métodos de transformação genética das principais espécies de interesse experimental e econômico. A agrotransformação tem ganhado grande aceitação pela facilidade do método de transformação e a alta taxa de plantas transgênicas geradas

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

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

Dentro dos estresses, os de tipo abiótico têm tido um interesse particular para aplicação na agricultura devido ao efeito negativo sobre o desenvolvimento e a produtividade em geral, bem como pelo temor às mudanças climáticas. Um dos tipos de estresses mais estudados e conseqüentemente com alto número de patentes é a seca,

que é a principal causa de déficit hídrico ou estresse osmótico nas plantas (**Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, et al. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crops Research 105: 1-14).**

- 5 Uma das mais recentes técnicas denominada microarrays ou chips de DNA tem permitido associar função a genes até então desconhecidos. Essa técnica permite conhecer a expressão de sequências de DNA de centenas de milhares de genes distintos usando *tags* moleculares fluorescentes que se acendem quando se liga uma fita complementar derivada de moléculas de RNA obtidas dos tecidos vegetais em estudo.
- 10 Desta forma os chips têm permitido conhecer e identificar genes envolvidos em diferentes processos da planta, como resposta a estresses abióticos, regulação gênica, acúmulo de sacarose, além de resistência a pragas, tolerância à escassez de água, interação planta-patógeno e etc.

- Dentre os diversos polinucleotídeos identificados por nosso grupo como
- 15 diferencialmente expressos sob condições de seca, o que codifica um polipeptídeo com similaridade a polipeptídeos relacionados à subunidade β da ATP sintase foi selecionado e o seu papel na proteção contra estresses abióticos é revelado nesta invenção. As ATP sintases são importantes enzimas que fornecem energia para as células e foram muito conservadas durante a evolução. As enzimas bacterianas possuem essencialmente a
- 20 mesma estrutura daquelas encontradas nas mitocôndrias de animais, plantas e fungos e também nos cloroplastos das plantas. Na maioria dos sistemas as ATP sintases são localizadas nas membranas e catalisam a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato direcionado pelo fluxo de prótons entre a membrana e gerados pela transferência de

elétrons. O fluxo parte do lado fotoquímico positivo (alto potencial eletroquímico) para o lado fotoquímico negativo. A reação catalizada pela ATP sintase é completamente reversível.

A estrutura das ATP sintases é formada por duas porções: uma porção solúvel F_1 que contém 5 subunidades (α , β , γ , δ , ϵ). Três sítios de ligação a substratos são encontrados nas subunidades β . Um sítio adicional de ligação ao nucleotídeo adenina é localizado na subunidade α . A subunidade F_1 cataliza a hidrólise do ATP. Na parte interna da célula encontra-se a porção F_0 que é consistida de 3 subunidades (a, b, c) (Mccarty RE (1992) A plant biochemist's view of H^+ -ATPases and ATP SYNTHASE. *Journal of Experimental Biology* 172: 431 – 441).

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

Ao nível celular, as membranas celulares servem como uma barreira permeável para a perda de água e de algumas moléculas importantes. Porém, durante o

estresse osmótico, a disponibilidade de água intercelular é restrita, o que altera as concentrações extracelulares de solutos, levando a um desequilíbrio osmótico. Desta forma ocorre um fluxo de água para fora das células, causando uma diminuição na turgência da célula e um aumento nas concentrações intracelulares de solutos. As espécies reativas de oxigênio e toxinas geradas durante esse processo também podem causar um dano extensivo para a célula.

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

A patente US7368630 descreve um método para usar o gene *DREB1A* para produzir uma linha de células vegetais, tecidos ou plantas com este fator

de transcrição, assim como os genes induzidos por desidratação a partir de estudos de microarrays. Por sua vez, o documento **US7259297**, descreve plantas transgênicas criadas pela introdução de um gene que codifica um fator de transcrição DREB que se liga ao elemento de resposta a seca DRE/CRT (Drought Response Element/Crepeat) e

5 ativa a transcrição de genes localizados em promotores com o referido motivo DRE. Segundo essa patente, a superexpressão do fator de transcrição DREB ativa os genes *Rd29A*, *Rd29B*, *Rd17*, *Rd22*, *DREB1A*, *Cor6*, *Cor15a*, *Erd1* e *Kin1*, induzindo uma resposta rápida na planta quando esta submetida ao estresse.

Da mesma forma, a patente **US7253000** compreende uma sequência de

10 ácido nucléico que utiliza um dos genes pertencentes ao grupo CBF (C-repeat/dehydration-responsive element binding factor, que é outro nome dado aos fatores DREB).

Outras patentes descrevem o uso de vários fatores de transcrição envolvidos na tolerância ao estresse em plantas como, por exemplo, a **WO2005024028** e

15 **JP2006158402**, que empregam fatores de transcrição tipo dedo de zinco (*Zinc finger*) para conferir tolerância a estresse hídrico nas plantas. Por sua vez, o documento **US2008163397**, utilizou o fator de transcrição *CAAT-binding*, conferindo tolerância a seca e ao estresse por frio, utilizando o domínio B do fator de transcrição. Da mesma forma, na patente **US2009265813** utiliza-se o fator de transcrição AP2, para obtenção de plantas

20 transgênicas relacionadas com múltiplas características, incluindo o crescimento reforçado da raiz e obtendo tolerância à seca como resultado final.

As patentes aqui mencionadas são reflexo do potencial biotecnológico dos genes que codificam fatores de transcrição, proteínas quinases e outras proteínas

envolvidas nas respostas das plantas à seca. Essas proteínas atuam protegendo diretamente componentes celulares durante a desidratação, bem como amplificando o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos de defesa. Nenhum documento apresenta proteção sobre sequências de polinucleotídeos que codifiquem sequências de polipetídeos com alta similaridade à

5 proteínas correspondentes à subunidade β da ATP sintase, como é o caso da presente invenção.

Apesar do crescimento em pesquisas com cana-de-açúcar, são poucos os exemplos de invenções que utilizam genes de cana para produção de plantas com maior

10 tolerância a estresses abióticos (**Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lutz C, Lutz-Meindl U (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. J Exp Bot 60: 939-954 e Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, et al. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 130: 218-229**). Além dos trabalhos acima citados recentemente dois pedidos de patente foram solicitados pelo nosso grupo (documentos **PCT/BR2011/000201** e **PCT/BR2011/000202**) onde reivindica-se a proteção do uso de dois genes de cana-de-açúcar (*Scdr1* e *Scdr2*) que codificam proteínas de funções desconhecidas que conferem

15 tolerância a seca e sal em plantas transgênicas de tabaco. O uso de genes de cana que dão tolerância a estresses abióticos, em contraponto a genes de outras espécies, permite a produção de plantas transgênicas da cana contendo genes da própria cana, os quais têm maior aceitação pelos consumidores. De fato, 70% dos consumidores dão suporte a

20

modificações genéticas envolvendo genes da própria espécie, em contraste com o suporte de 26% quando se tratam de genes de outras espécies (**Rommens CM (2010) Barriers and paths to market for genetically engineered crops. Plant Biotechnology Journal 8: 101-111**).

5 Portanto, esta invenção relaciona-se com a direta manipulação de uma sequência de DNA que codifica um polipetídeo de cana-de-açúcar com similaridade à subunidade β de ATP sintases. Esta invenção descreve também a construção de vetores que contém a sequência do polipetídeo de cana-de-açúcar, bem como um processo de produção de plantas transgênicas de forma a produzir um fenótipo de tolerância a
10 estresse hídrico e salino, maior biomassa e maior fotossíntese, dentre outros possíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

 A presente invenção descreve um método de produção de plantas que contém em suas células uma sequência de polinucleotídeos de cana-de-açúcar e a superexpressão dessa sequência leva à maior tolerância a estresses abióticos à planta
15 em questão.

 Em uma forma mais ampla, o polinucleotídeo de cana-de-açúcar é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um polinucleotídeo de DNA recombinante no sentido 5' para 3', que compreende um promotor que funciona em
20 plantas, operacionalmente ligado a um segundo polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de cana, operavelmente ligado ao terminador que finaliza a transcrição do polinucleotídeo de DNA fornecendo um sítio de poliadenilação.

A invenção também descreve uma sequência de DNA recombinante em que o promotor é selecionado do grupo constituído por promotores induzíveis, promotores constitutivos, promotores regulados temporalmente, promotores com preferência por tecidos, promotores de estresses específicos, promotores induzíveis por seca, promotores induzíveis pelo déficit de água, e os promotores tecido-específicos.

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

A invenção também descreve um método para produção de plantas tolerantes aos estresses abióticos, graças à transformação genética com uma molécula de DNA recombinante que expressa um polipeptídeo de cana, bem como as plantas e suas células e propágulos, como sementes, contiverem em seu genoma moléculas desse DNA recombinante.

Tais plantas apresentam uma ou mais das seguintes propriedades: uma maior taxa de crescimento em condições onde a seca e/ou o estresse salino seriam limitantes para o crescimento de uma planta não-transformada da mesma espécie, uma

maior taxa de crescimento em condições onde a água seria limitante para o crescimento de uma planta não-transformada da mesma espécie, uma maior taxa de crescimento, sob condições em que o aumento de sais ou íons no solo e / ou água seria limitante para o crescimento de uma planta não-transformada da mesma espécie, maior porcentagem de plantas sobreviventes após um período prolongado de seca ou sob estresse salino do que uma planta não-transformada da mesma espécie, um rendimento maior quando comparado a uma planta não-transformada da mesma espécie, ou maior tolerância à seca em comparação com uma planta não-transformada da mesma espécie.

A presente invenção compreende a propagação das plantas geneticamente modificadas, com a finalidade de gerar sementes, plantar tais sementes no solo, ou brotação, como é o caso de uso de toletes em cana-de-açúcar, e que permite o crescimento das plantas sob condições de estresse. Mais especificamente, esta invenção fornece um método para produzir uma planta que tem como uma das características, tais como tolerância a estresses abióticos, aumento ou incremento no rendimento da massa de raízes. A invenção compreende as etapas de inserir no genoma de uma célula de planta, a construção de uma molécula de DNA recombinante compreendendo um polinucleotídeo de cana-de-açúcar, a obtenção de uma célula de planta transformada ou células transformadas, a regeneração de plantas transformadas de células vegetais e a seleção de plantas que apresentam melhores características agronômicas. Uma das características da invenção é o fato das plantas selecionadas apresentarem maior tolerância a estresses abióticos selecionado do grupo consistindo de tolerância ao estresse salino, tolerância à seca e sobrevivência após o a combinação de estresses abióticos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Sequência de polinucleotídeo (SEQ ID NO: 1) e sequência do polipeptídeo deduzido (SEQ ID NO: 2).

Figura 2: Análise por PCR em tempo real da expressão do gene que codifica a subunidade β da ATP sintase em amostras de duas variedades de cana-de-açúcar. Entre as variedades utilizadas a RB867515 é considerada tolerante a seca enquanto a RB855536 é considerada sensível. Os dados mostram que gene estudado é induzido por seca na variedade RB855536. As barras correspondem a expressão relativa do gene utilizando a condição de irrigação como controle. TI: variedade tolerante RB867515 irrigada; TS: variedade tolerante RB867515 sequeiro; SI: variedade sensível RB855536 irrigada; SS: variedade sensível RB855536 sequeiro.

Figura 3: Vetor binário, pCambia2301::C10, utilizado na agrotransformação de plantas de tabaco. Os cassetes de seleção, repórter e de expressão do polipeptídeo codificado pela SEQ ID:1 foram clonados sob controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor CamV35S e o terminador do gene da Nopalina sintase (NOS) de agrobactéria. Para a seleção foi utilizado o gene nptII que confere resistência ao antibiótico canamicina e como repórter o gene *uidA* que codifica a proteína β -glucuronidase (GUS).

Anexo 1: Fases da transformação genética de tabaco. (A) Produção de explantes que serão utilizados na transformação de tabaco. Sementes de tabaco selvagem germinadas em placas de petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytigel. As plantas foram crescidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro ($300\text{--}400\ \mu\text{mol}\ \text{fótons}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) a 25°C e umidade relativa de 75–80%. (B) Discos foliares de tabaco após a infecção com agrobactérias e mantidas em placa contendo meio

MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0.1 mg/L de ácido naftalenocético e 0,0059g/L de acetoseringona) por 3 dias. (C) Os discos infectados em meio seletivo (saís MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina). (D) Regeneração de plantas tolerantes ao antibiótico canamicina em placas contendo meio MS com 200 mg/L de canamicina. (E) Transferencia das plantulas para fracos contendo meio MS para o alongamento e enraizamento.

Anexo 2: O produto da reação de PCR visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. Dentre as 9 amostras de plantas que apresentaram a coloração azul para o ensaio histoquímico de GUS, a presença do gene *nptII* foi confirmada em todas. A coluna identificada com Br equivale a ausência de amplificação em uma planta não transformada.

Anexo 3: Análise fenotípica de plantas selvagens (não modificadas geneticamente) e transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 após estresse hídrico. (A) Porcentagem de plantas sobreviventes após o estresse por seca. Plantas de dois meses de idade foram privadas de água por 15 dias e rehidratadas por 3 dias. O experimento foi realizado com 6 réplicas biológicas e o número de plantas sobreviventes foi contado. (B) Planta sobrevivente na esquerda e planta morta na direita. As plantas foram mantidas em condições normais até o florescimento.

Anexo 4: Efeitos de diferentes concentrações de NaCl em discos foliares de tabaco transgênico contendo a SEQ ID NO.1 e selvagem. Discos foliares de plantas transformadas com vetor contendo a SEQ ID NO:1 e selvagens foram tratados com 1 mL de meio MS líquido meia força com 0 a 400 mM de NaCl por 5 dias. (A) Discos foliares utilizados como padrão para avaliar os efeitos do estresse salino. Os fenótipos visuais

foram escalonados de 1 a 4 de acordo com a intensidade da cor verde e o tamanho. (B) 6 discos de cada planta foram coletados e inoculados em meio MS contendo NaCl e após 5 dias os efeitos do estresse salino foram avaliados e escalonados de acordo com os padrões mostrados em (A). (C) Conteúdo total de clorofila das linhagens transgênicas e selvagem após estresse salino. O experimento foi realizado com 4 réplicas biológicas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método para produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais graças à introdução de um polinucleotídeo de cana-de-açúcar que codifica um polipeptídeo com similaridade à subunidade β de ATP sintase. A sequência do polinucleotídeo é descrita na sequência SEQ ID NO: 1 (**Figura 1A**), e o polipeptídeo deduzido a partir dessa sequência de DNA está indicado na SEQ ID NO: 2 (**Figura 1B**).

O invento descrito neste documento refere-se a um vetor de DNA recombinante compreendendo a sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 1, útil para produzir plantas transgênicas e um método para produção de plantas geneticamente modificadas que superexpressam uma molécula de ácido nucléico da SEQ ID NO: 1, envolvida na resposta das plantas a estresses abióticos, e cuja superexpressão produz uma melhora significativa na resposta da planta a esses estresses. Assim, determina-se que o polinucleotídeo indicado na SEQ ID NO:1 controla direta ou indiretamente a resposta de plantas contra esses estresses.

Como tal, as aplicações da invenção incluem, mas não estão limitadas, à melhora da produção de plantas que sejam tolerantes a esses estresses abióticos. Da

mesma forma, a invenção compreende as sequências com identidade igual ou superior a 60% à SEQ ID NO: 1, mas não limitantes a somente elas.

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

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

Para a transformação de plantas, o plasmídeo de preferência também inclui um gene marcador de seleção, embora existam métodos que prescindam do uso desse tipo de gene marcador. Marcadores seleção de vegetais comumente usados incluem o gene de resistência a canamicina, (neomicina fosfotransferase II ou *nptII*), o gene de
20 resistência a higromicina (higromicina fosfotransferase ou *HPT*), o gene de fosfinotricina acetil transferase (*bar*), o gene 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (*EPSPS*), ou gene da acetolactato sintase (*ALS*). Na presente invenção, o marcador de seleção é o gene *NptII*, que permite a seleção dos transformantes com o antibiótico canamicina.

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

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

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

O plasmídeo é de preferência um vetor de transformação de plantas binário em que os polinucleotídeos de interesse são inseridos dentro das bordas do T-DNA. Exemplos de tais vetores de transformação de plantas que podem ser usados na presente invenção são vetores obtidos a partir de fontes comerciais, tais como a série 5 pCambia, pBI121 ou pGreenII que contém uma origem RK2 de baixa replicação, o gene marcador da neomicina-fosfotransferase (*nptII*), e o terminador da nopalina sintase (NOS), promotor constitutivo e um sinal 3' NOS de poliadenilação.

Para a produção de plantas transgênicas, qualquer método adequado para a transformação de monocotiledôneas ou dicotiledôneas pode ser usado, como, por 10 exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento de partículas (também conhecida como transformação de biobalística ou biolística). Na transformação mediada por *Agrobacterium*, as células vegetais são colocadas em contato com um inóculo de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o DNA indicado na SEQ ID NO: 1 da invenção. Bactérias do gênero *Agrobacterium* que podem ser utilizados para 15 transformar células vegetais incluem espécies de *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens* de preferência cepas de *A. tumefaciens* LBA4404, EHA105 ou GV301. *Agrobacterium spp.* são transformadas com o plasmídeo por métodos convencionais conhecidos.

Por sua vez, utilizando-se um protocolo de transformação de discos 20 foliares, bactérias de *A. tumefaciens* com o DNA indicado na SEQ ID NO:1 clonado em vetor binário são cultivadas em um meio de crescimento na presença de antibióticos, como por exemplo, canamicina, para selecionar as células bacterianas que possuem o plasmídeo binário. Em seguida, folhas de tabaco selvagem são esterilizadas

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

Adicionalmente, a presente invenção refere-se à produção de plantas
10 transgênicas transformadas com plasmídeos contendo a sequência indicada em SEQ ID NO:1, aumentando sua tolerância a estresses abióticos, como seca e alta salinidade.

Outra abordagem para se aumentar os níveis de expressão de SEQ ID NO:
1 pode ser a produção de plantas geneticamente modificadas que superexpressem genes que induzam a atividade do promotor do gene endógeno, como é o caso de genes que
15 codificam fatores de transcrição.

Assim, a invenção descreve o método para produção de plantas transgênicas que contém em suas células um gene quimérico com capacidade de expressão em células vegetais, assim como as subsequentes gerações compreendendo uma sequência de DNA de SEQ ID NO: 1 e sequências de DNA que permitam a
20 expressão do polipetídeo SEQ ID NO:2 em células vegetais.

Plantas transgênicas, de acordo com a invenção, incluem, sem limitação, os cereais, como trigo, cevada, milho, arroz, aveia, gramíneas forrageiras, turfa, outras monocotiledôneas como cana-de-açúcar, miscanthus, ou qualquer espécie de cultura de

outros alimentos como o feijão, a soja, ervilha, tomate, colza, bem como outras espécies de interesse econômico, como o tabaco, a laranja, etc.

EXEMPLOS

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

5 AÇÚCAR

Para avaliar o padrão de expressão do polinucleotídeo SEQ ID NO: 1 sob seca foi feito um Real time-PCR quantitativo conforme descrito por Rocha *et al* (Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Vencio RZN, Vicentini R, et al. (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *Bmc Genomics* 8) utilizando folhas de uma variedade de cana com maior tolerância à seca (RB867515) e de outra com maior sensibilidade à seca (RB855536) mantidas sob irrigação ou em sequeiro (com suspensão de rega, equivalente à estresse por seca). Como gene de referência foi utilizado o gene da poliubiquitina de cana.

A expressão sob seca (sequeiro) foi determinada a partir do método 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408), utilizando amostras não submetidas ao estresse (irrigadas) como controle. A significância estatística das diferenças de expressão gênica relativas foi determinada assumindo-se um modelo log-normal que calcula a probabilidade Pr (amostra > referência) e Pr (amostra < referência) para genes induzidos e reprimidos, respectivamente. O Perfil de expressão foi considerado válido quando $P \geq 0,95$. Para cada tratamento foram usadas folhas de três plantas.

O resultado da análise por PCR em tempo real mostrou a indução do gene que codifica a subunidade β da ATP sintase é induzido por estresse por déficit hídrico na variedade mais sensível a seca (RB855536) e é mostrado na **figura 2**.

Exemplo2: CLONAGEM DA SEQ ID NO: 1 DE CANA-DE-AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE UM CASSETE RECOMBINANTE.

Um clone com sequência de polinucleotídeos de cana-de-açúcar com similaridade a genes que codificam a subunidade β da proteína ATP sintase foi obtido do Brazilian Clone Collection Center (BCCCENTER, Jaboticabal, Brasil). A partir desse DNA a sequência codificante, indicada na SEQ ID NO: 1 (**Figura 1**), foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos 5'- CCATGGTGGCGCTGGACAAG-3' e 5'- GGTCACCTCAGGCGGATGGG -3', e clonada no vetor pGEMT-Easy (Promega, EUA). Posteriormente, um fragmento contendo a SEQ ID NO: 1 foi retirada do vetor pGEMT-Easy com a enzima *EcoRI* e inserido no vetor pRT104 digerido com a mesma enzima. O cassete de expressão foi liberado pela digestão com *HindIII* e clonado no vetor de expressão pCAMBIA 2301 (Cambia, Australia), também digerido com a mesma enzima. A construção recombinante final resultante, pCAMBIA2301::C10 (**Figura 3**) foi introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 .

Exemplo 3: PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

Sementes selvagens de tabaco (*Nicotiana tabacum*, var. SR1) foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytigel. As plantas foram crescidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro ($300\text{--}400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25°C e umidade relativa de 75–80%.

Folhas de tabaco foram cortadas em discos pequenos e incubadas com suspensões de *A. tumefaciens* por 5 a 10 min. Após isto, as folhas infectadas foram transferidas ao meio MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0.1 mg/L de ácido naftalenocético e 0,0059g/L de acetoseringona) por 3 dias. Os discos infectados foram transferidos para meio seletivo (sais MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina). As plantas que começaram a se desenvolver foram transferidas para meio MS com 200 mg/L de canamicina (**Anexo 1**). As plantas enraizadas foram transferidas para o substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas em casa-de-vegetação sob condições normais até o florescimento e coleta de sementes.

10 **Exemplo 4: ANÁLISES DA PRESENÇA DA SEQ ID NO: 1 EM PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS**

A caracterização inicial das plantas enraizadas e transferidas para solo foi feita primeiramente pelo ensaio histoquímico utilizando-se o X-Gluc como substrato para a detecção do gene beta-glucuronidase, também inserido no cassete de expressão.

15 Observou-se que um grande número de plantas apresentou forte coloração azul, as quais foram utilizadas para confirmar a integração do transgene contendo a SEQ ID NO:1 por PCR, utilizando-se DNA genômico como molde.

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

maria a 65°C, por 10 minutos e 130 µL de Acetato de Potássio 5M foram adicionados e, então, os tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos.

Em seguida, os tubos foram centrifugados numa microcentrífuga a 15.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL contendo 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de sódio 3M, misturado por inversão e incubado a -20°C por 10 minutos. Em sequência, os tubos foram centrifugados numa a 15.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado nos próprios tubos com álcool 70%, por três vezes e foram adicionados 100 µL de água ultra pura acrescida de RNase A 100 mg/mL e então incubada a 37°C por 30 minutos. O DNA genômico foi armazenado a 4°C.

A presença de SEQ ID NO: 1 no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de tabaco foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene *nptII* (**Anexo 2**). Inicialmente foram utilizados 1.0 µL de DNA, 0.5 µL dNTP (10mM), 1.0 µL MgCl₂ (25mM), 0.75 µL de *Primer* direto (10µM), 0.75 µL *Primer* reverso (10µM), 2.5 µL Tampão Taq 10x, 0.3 µL Taq Polimerase (Fermentas), 18.2 µL de água Milli-Q e essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 10 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 65°C, 1 minuto à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. Dentre as 9 amostras de plantas que apresentaram a coloração azul para o ensaio histoquímico de GUS, a presença do gene *nptII* foi confirmada em todas. Essas plantas foram utilizadas nos

ensaios posteriores para observar os efeitos da SEQ ID NO:1 nas características das plantas de tabaco transgênicas.

Exemplo 5: ANÁLISE DOS EFEITOS DA SUSPENSÃO DE REGA NAS PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

5 Para verificar a resposta à suspensão de rega das plantas transgênicas em comparação com as plantas selvagens foram utilizadas plantas de tabaco (T2) em que a homozigose do transgene foi verificada. Para isso sementes das linhagens homozigotas foram germinadas e as plantas foram transferidas para potes com 300 g de substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas sob condições normais de rega até atingirem 2
10 meses de idade. Esse procedimento foi realizado com plantas do tipo selvagem e com plantas transgênicas identificadas no Exemplo 4.

Plantas de dois meses de idade de três eventos independentes (27.3, 21.1 e 20.5) e selvagens foram expostas a suspensão de rega por 15 dias e foram posteriormente reidratadas por 3 dias. O experimento foi realizado com 6 réplicas
15 biológicas de cada linhagem (transgênicas e selvagem) e o número de plantas sobreviventes foi contado (**Anexo 3A**). A diferença entre o número de plantas que tiveram a capacidade de se recuperarem após o período de seca foi significativamente diferente entre as linhagens transgênicas e as plantas selvagens. As linhagens transgênicas 27.3, 21.1 e 20.5 que contém a SEQ ID NO: 1 apresentaram as taxas de sobrevivência ao
20 período de seca de 88,3%, 66,6% e 66,6% respectivamente, enquanto a linhagem não transformada apresenta uma taxa de sobrevivência de 16,6%. O **Anexo 3B** mostra uma planta sobrevivente (transgênica) e uma planta não sobrevivente (selvagem).

Estes dados mostram que a presença de vetor contendo a SEQ ID NO: 1 aumenta a tolerância à seca.

Exemplo 6: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SALINO EM DISCOS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

5 Discos foliares de 3 eventos transgênicos independentes que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens foram tratados com 1mL de meio MS líquido meia força com 0, 200, 300 e 400 mM de NaCl por 5 dias. Após o período ao qual os discos foram submetidos ao estresse salino, estes foram numerados, dispostos aleatoriamente e quatro pessoas foram solicitadas para atribuir notas de 1 a 4 para os efeitos fenotípicos
10 do estresse baseando-se em 4 padrões previamente estabelecidos (**Anexo 4A**). Nenhum avaliador teve conhecimento prévio de quais discos correspondiam a linhagens transgênicas ou selvagens bem como quais eram as réplicas do experimento. A média entre as notas atribuídas pelos 4 avaliadores para cada uma das amostras foi calculada para inferir a severidade do estresse (**Anexo 4B**). Dados mostram que as linhagens
15 transgênicas são mais tolerantes ao tratamento com 200 mM de NaCl do que as plantas não transformadas e que não existe diferença significativa entre transgênicos e selvagens nos outros tratamentos testados. Após a avaliação do fenótipo visual, o conteúdo de clorofila foi quantificado como descrito por Arnon (1949) (**Arnon, D.I. (1949). Plant Physiology 24: 1-15**) O NaCl causou uma redução no teor de clorofila em todas as
20 plantas. No entanto, os dados confirmam que a retenção da clorofila nos eventos transformados com a SEQ ID NO: 1 é maior do que nas plantas não transformadas no tratamento com 200 mM de NaCl (**Anexo 4C**).

Os dados acima descritos permitem concluir que a presença de vetor contendo a SEQ ID NO: 1 proporciona uma melhoria na tolerância ao estresse salino.

Página 1
SEQUENCE LISTING

<110> Universidade Estadual de Campinas

<120> Polinucleotídeo de cana-de-açúcar que confere tolerância a estresses abióticos

<130> -

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 482

<212> DNA

<213> Saccharum spp

<400> 1

```
cggcgatcgc gaccgagttc ctgctgctca tgggtggcgct ggacaagctc tacttttacgc      60
ccctgggcaa gttcatggac gagcgggacg ccaagatccg cggcgagctc ggcgacgtca      120
aggacgcctc cgaggaggtg aagcagctgg aggagcaggc ggtcgccatc atgaaggcgg      180
cgcgcgccga gatcgcgggc gcgctcaaca agatgaagaa ggagaccacc gcggagctgg      240
aggccaagct ggaggagggc cgcagccgcg tggaggccga gctcgtcgag gcgctcgcca      300
acctcgaggc gcagaaagag gaggccgtca aggcgctcga cgcgcagatc gcctcgctca      360
gcgatgagat cgtcaagaag gtgctcccat ccgcctgagg aaaccaaacc agcgagccgg      420
ccgggccggg gggcgttcct tagcttttct gatcagtgtg tatacgctgg tcgggctgcc      480
gt                                                                                   482
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Saccharum officinarum

<400> 2

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

Página 2

Val Glu Ala Glu Leu Val Glu Ala Leu Ala Asn Leu Glu Ala Gln Lys
85 90 95

Glu Glu Ala Val Lys Ala Leu Asp Ala Gln Ile Ala Ser Leu Ser Asp
100 105 110

Glu Ile Val Lys Lys Val Leu Pro Ser Ala
115 120

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de plantas geneticamente modificadas, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

5

a) Produção de um vetor que compreenda a sequência polinucleotídica de interesse descrita em SEQ ID NO:1;

b) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas;

c) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas;

10

d) Inserção do dito vetor compreendendo a sequência descrita em SEQ ID NO:1, o promotor e o terminador no genoma de célula vegetal, planta ou partes de plantas.

2. Método para produção de plantas geneticamente modificadas, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

15

a) Produção de um vetor que compreenda pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO:1;

b) Produção de um vetor em que a sequência com pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas;

20

c) Produção de um vetor em que a sequência com pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO:1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas;

d) Inserção do dito vetor compreendendo a sequência com pelo menos 60% de identidade com a descrita em SEQ ID NO:1, o promotor e o terminador no genoma de célula vegetal, planta ou partes de plantas.

- 5 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** plantas geneticamente modificadas apresentarem no seu genoma a sequência gênica SEQ ID NO:1.
4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelas** plantas geneticamente modificadas apresentarem no seu genoma sequência gênica com pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO:1.
- 10 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** sequência gênica SEQ ID NO:1 ser obtida de cana-de-açúcar.
6. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledônias.
7. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** poder ser aplicado em dicotiledônias.
- 15 8. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser aplicado em tabaco.
9. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser aplicado em cana-de-açúcar, soja, milho, arroz e trigo.
- 20 10. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** permitir a integração do vetor no genoma da célula vegetal.
11. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** modular a tolerância da planta a estresses ambientais.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** estresse ambiental ser preferencialmente seca.
13. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** estresse ambiental ser preferencialmente salinidade.
- 5 14. Vetor de DNA recombinante, **caracterizado por** compreender a sequência polinucleotídica descrita em SEQ ID NO:1.
15. Vetor, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** compreender uma sequência de polinucleotídeos responsável pela produção de um polipeptídeo descrito na SEQ ID NO: 2.
- 10 16. Vetor de DNA recombinante, **caracterizado por** compreender uma sequência polinucleotídica com pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO:1.
17. Vetor, de acordo a reivindicação 16, **caracterizado por** compreender uma sequência de polinucleotídeos responsável pela produção de um polipeptídeo com pelo menos
- 15 60% de identidade com a SEQ ID NO: 2.
18. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** ser vetor de expressão ou vetor de clonagem.
19. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** poder ser um plasmídeo.
- 20 20. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado pelas** sequências polinucleotídicas de interesse serem inseridos entre as bordas do T-DNA de um vetor binário.

21. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** conter um promotor operacionalmente ligado à sequência polinucleotídica de interesse.
22. Vetor, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** promotor ser preferencialmente o promotor CaMV 35 S do vírus do mosaico do couve-flor.
- 5 23. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** conter um terminador operacionalmente ligado à sequência polinucleotídica de interesse.
24. Vetor, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado pelo** ácido nucléico que codifica o terminador ser, preferencialmente, o da nopalina sintase (NOS).
25. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** poder conter um
10 gene marcador.
26. Vetor, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pelo** gene marcador ser preferencialmente o gene *NptII*.
27. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** poder conter um gene repórter.
- 15 28. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** ser capaz de permitir a transferência de DNA para célula vegetal, planta ou partes de plantas.
29. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de célula vegetal, planta ou partes de planta.
30. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado
20 para produção de sementes a partir de plantas que contém a sequência de interesse descrita em SEQ ID NO:1.

31. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de sementes a partir de plantas que contém sequência de interesse com pelo menos 60% de identidade com a descrita em SEQ ID NO:1.
- 5 32. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de partes de plantas usadas com a finalidade de reprodução assexuada a partir de plantas que contém a sequência descrita em SEQ ID NO:1.
- 10 33. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de partes de plantas usadas com a finalidade de reprodução assexuada a partir de plantas que contém sequência polinucleotídica com pelo menos 60% de identidade com a descrita em SEQ ID NO:1.
34. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de progênie de plantas que contém a sequência descrita em SEQ ID NO:1.
- 15 35. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de progênie de plantas que contém sequência polinucleotídica com pelo menos 60% de identidade com a descrita em SEQ ID NO:1.
36. Uso do vetor descrito nas reivindicações de 14 a 28 **caracterizado por** conter a sequência polinucleotídica de interesse descrita em SEQ ID NO:1.
- 20 37. Uso do vetor descrito nas reivindicações de 14 a 28 **caracterizado por** conter sequência polinucleotídica com pelo menos 60% de identidade com a descrita em SEQ ID NO:1.
38. Uso da sequência descrita em SEQ ID NO: 1 **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledônias ou dicotiledônias.

39. Uso das sequências gênicas que apresentam pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO: 1, **caracterizado por** poder ser aplicado em monocotiledônias ou dicotiledônias.

```

1  CGGCGATCGC  GACCGAGTTC  CTGCTGCTCA  TGGTGGCGCT  GGACAAGCTC
                                M  V  A  L  D  K  L

51  TACTTTACGC  CCCTGGGCAA  GTTCATGGAC  GAGCGGGACG  CCAAGATCCG
    Y  F  T  P    L  G  K    F  M  D    E  R  D  A    K  I  R

101 CGGCGAGCTC  GGCGACGTCA  AGGACGCCTC  CGAGGAGGTG  AAGCAGCTGG
     G  E  L    G  D  V  K    D  A  S    E  E  V    K  Q  L  E

151 AGGAGCAGGC  GGTCGCCATC  ATGAAGGCGG  CGCGCGCCGA  GATCGCGGCG
     E  Q  A    V  A  I    M  K  A  A    R  A  E    I  A  A

201 GCGCTCAACA  AGATGAAGAA  GGAGACCACC  GCGGAGCTGG  AGGCCAAGCT
     A  L  N  K    M  K  K    E  T  T    A  E  L  E    A  K  L

251 GGAGGAGGGC  CGCAGCCGCG  TGGAGGCCGA  GCTCGTCGAG  GCGCTCGCCA
     E  E  G    R  S  R  V    E  A  E    L  V  E    A  L  A  N

301 ACCTCGAGGC  GCAGAAAGAG  GAGGCCGTCA  AGGCGCTCGA  CGCGCAGATC
     L  E  A    Q  K  E    E  A  V  K    A  L  D    A  Q  I

351 GCCTCGCTCA  GCGATGAGAT  CGTCAAGAAG  GTGCTCCCAT  CCGCCTGAGG
     A  S  L  S    D  E  I    V  K  K    V  L  P  S    A  *

401 AAACCAAACC  AGCGAGCCGG  CCGGGCCGGT  GGGCGTTCCT  TAGCTTTTCT

451 GATCAGTGTG  TATACGCTGG  TCGGGCTGCC  GT

```

Figura 1

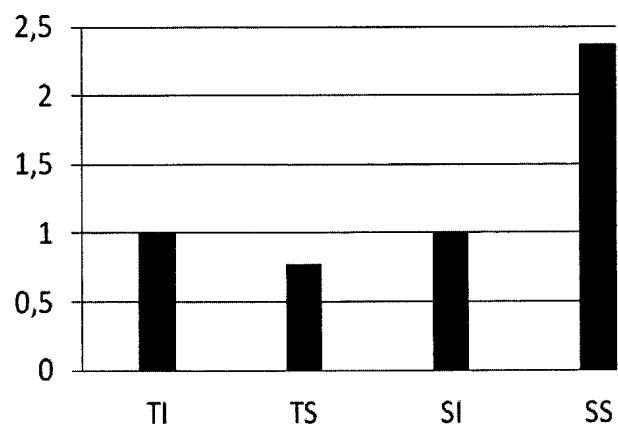


Figura 2

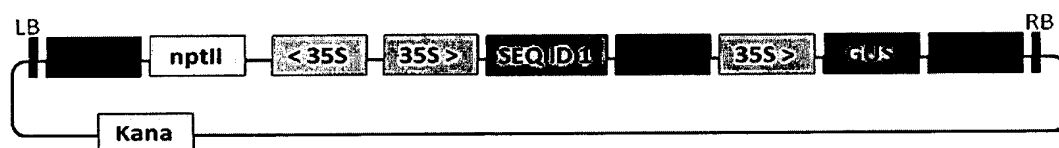


Figura 3

RESUMO

POLINUCLEOTÍDEO DE CANA-DE-AÇÚCAR QUE CONFERE TOLERÂNCIA A

ESTRESSSES ABIÓTICOS

5 As plantas são influenciadas por um grande número de fatores ambientais bióticos e abióticos e recorrentemente estresses abióticos são mais graves, afetando todas as funções da planta, resultando em redução do crescimento e da produtividade. Nesse sentido, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância abióticos são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares tolerantes à seca. Dessa forma, a presente invenção descreve um método de

10 produção de plantas que contém em suas células uma sequência de nucleotídeos de cana-de-açúcar. A expressão do vetor que contém a sequência poderá levar a planta na qual ele é inserido à maior tolerância a estresses abióticos. De uma forma mais ampla, é descrito um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de cana-de-açúcar, o qual é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas e este

15 polinucleotídeo confere tolerância a diferentes estresses abióticos.