



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

(21) BR 102014004881-2 A2



(22) Data do Depósito: 28/02/2014

(43) Data da Publicação: 02/02/2016
(RPI 2352)

(54) **Título:** MÉTODO PARA PROMOVER UM AUMENTO DA BIOMASSA E PRODUTIVIDADE VEGETAL E DA TOLERÂNCIA À SECA

(51) **Int. Cl.:** C12N 15/63; C12N 15/82; C12N 15/29

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(72) **Inventor(es):** ADRIANA SILVA HEMERLY, CARINNE DE NAZARÉ MONTEIRO COSTA, LUIZ MORS CABRAL, VANESSA COSTA LURIF

(74) **Procurador(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA PROMOVER UM AUMENTO DA BIOMASSA E PRODUTIVIDADE VEGETAL E DA TOLERÂNCIA À SECA. A presente invenção se refere a um método para promover um aumento da biomassa de vegetais, e da sua produtividade. O referido aumento tem seus efeitos visíveis em órgãos como folha, caule, raiz e na produção de frutos e sementes. Além disso, a invenção é capaz de aumentar a tolerância dos referidos vegetais à seca.

**MÉTODO PARA PROMOVER UM AUMENTO DA BIOMASSA E PRODUTIVIDADE
VEGETAL E DA TOLERÂNCIA À SECA**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a um método para
5 promover um aumento da biomassa exacerbado de vegetais,
como um todo, levando a um aumento de biomassa e de
produtividade de sementes. O referido aumento tem seus
efeitos visíveis em órgãos como folha, caule, raiz e na
produção de frutos. Além disso, a invenção é capaz de
10 aumentar a tolerância dos referidos vegetais à seca.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O aumento da população mundial provoca uma
crescente demanda por alimento, energia e pelos recursos
naturais. A produção de alimentos está intimamente
15 relacionada com a disponibilidade de água, já que em grande
parte da superfície terrestre, esse é o fator limitante
para a produtividade agrícola. Desse modo, o constante
aumento das commodities agrícolas, somado às mudanças
climáticas, vem tornando o uso dos recursos hídricos
20 insustentável. Nesse cenário, surge a necessidade de
aumentar a produtividade agrícola de maneira sustentável,
ou seja, produzir mais utilizando menos água (Karaba et al,
2007; Morison et al, 2008; FAO, 2012). Outro problema a ser
enfrentado é a disponibilidade de áreas para cultivo, pois
25 cada vez mais essas áreas estão escassas e há também uma
grande preocupação com a conservação e preservação da
biodiversidade.

[003] Muitos esforços estão sendo feitos para reduzir o
uso de água pela agricultura, e produzir "mais por gota" e

por hectare. Um dos meios para alcançar essa maior produtividade agrícola pode ser através do melhoramento vegetal. Desse modo é possível aumentar o rendimento, como também minimizar as perdas decorrentes dos estresses bióticos e abióticos (Morison et al, 2008; Parry & Hawkesford, 2012).

[004] No entanto, para se alcançar o melhoramento vegetal, muitas vezes é necessária a intervenção no ciclo celular do vegetal. Como é de conhecimento, o ciclo celular é uma etapa fundamental e conservada no ciclo de vida dos organismos eucarióticos, onde o material genético da célula-mãe é duplicado e dividido entre as duas células filhas. Esse processo é coordenado com mudanças na arquitetura da célula e possui quatro estágios bem definidos: a fase de síntese, mitose e dois intervalos, conhecidos como gap1 (G1) e gap2 (G2).

[005] Na fase de síntese (fase S) o DNA é replicado para produzir cópias para as duas células filhas, durante o intervalo G2 novas proteínas são sintetizadas e a célula dobra de tamanho, já na mitose (fase M) os cromossomos duplicados são separados, de modo que cada célula filha receba uma cópia.

[006] No intervalo entre a mitose e a fase de síntese do DNA (intervalo G1) o DNA nuclear é preparado para a replicação.

[007] Erros na progressão desse ciclo podem trazer sérias consequências para a integridade do genoma e consequentemente para o desenvolvimento do organismo. Assim, para garantir que os eventos ocorram adequadamente e

o DNA seja duplicado apenas uma vez, as células possuem pontos de controle (checkpoints) entre as transições (Berkmans e De Veylder, 2009; Ramires- Parra et al, 2005).

[008] O primeiro checkpoint determina se a célula entrará na fase de síntese (G1) ou permanecerá no estado quiescente. A primeira etapa da fase de síntese, caso a célula vá se dividir, é a formação de uma estrutura que irá regular todo o processo de divisão celular, o complexo pré-replicativo (pré-RC) (Tuteja et al, 2011; Costas et al, 2011).

[009] A primeira etapa para a formação do pré-RC é o reconhecimento das origens de replicação do DNA pelo Complexo de Reconhecimento de Origem (ORC). Após este reconhecimento as proteínas CDC6 e CDT1 se juntam ao complexo ORC e irão recrutar o complexo MCM, que possui atividade helicase, que culmina com o licenciamento do DNA para a replicação (Blow and Dutta, 2005; Sun & Kong, 2010; Tuteja et al, 2011; Gutierrez et al, 2002).

[0010] Recentemente foi revelado em um artigo de nosso grupo (MASUDA H. P., CABRAL L. M., DE VEYLDER L., TANURDZIO M., DE ALMEIRA ENGLER J., GEELEN D. INZE D., MARTIENSSEN R. A., FERREIRA P. A. HEMERLU A. S. - *ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription, EMBO Journal, 2008*) um novo mecanismo de regulação do ciclo celular da *Arabidopsis thaliana*, no qual a proteína ABAP1 tem um papel central. Essa proteína interage com membros da maquinaria de replicação do DNA, fatores de transcrição e outras classes de proteínas (Masuda et al., 2008). Uma dessas proteínas com a qual

ABAP1 interage foi chamada AIP10. Plantas nocaute para o gene AIP10 apresentam sistema radicular e folhas maiores, produzem mais sementes e possuem maior resistência à situação de estresse hídrico.

5 [0011] Outras pesquisas e invenções também foram realizadas para a promoção de aumento da biomassa de vegetais, no entanto por meio de diferentes métodos. Por exemplo, o Pedido Internacional WO/2011/130815 revela um método para o aumento da biomassa vegetal através da
10 introdução de uma sequência polinucleotídica no genoma da planta.

[0012] Através da utilização de DNA recombinante, o requerente do pedido EP2295582 busca o melhoramento de espécimes vegetais e através do controle da expressão do
15 ácido nucleico CDC27A a invenção descrita no pedido WO2004029257 procura alterar o desenvolvimento de uma planta.

[0013] O pedido de patente EP2391642 se refere a um complexo proteico que promove o crescimento vegetal. Mais
20 especificamente, a invenção refere-se à utilização de proteínas específicas do complexo de promoção da anáfase/ciclossoma para aumentar as taxas de crescimento de brotos e / ou melhorar as taxas de divisão celular. O referido pedido relata ainda um método para o aumento do
25 crescimento de plantas através da superexpressão do gene APC10 e/ou de seus variantes ou da repressão do gene SAMBA e/ou de seus variantes. Os genes cujas atividades foram alteradas no pedido de patente EP2391642 são distintos e regulam, no ciclo celular, processos diferentes dos

apresentados na presente invenção.

[0014] Na presente invenção busca-se uma modulação do ciclo celular através de uma modulação da expressão do gene que codifica a proteína AIP10 que regula a atividade da
5 proteína ABAP1 que por sua vez interage com membros da maquinaria de replicação do DNA, fatores de transcrição e outras classes de proteínas fazendo com que haja um aumento da biomassa da planta. Enquanto isso, no pedido de patente EP2391642 relata-se um processo de aumento do crescimento
10 da planta através da superexpressão do gene APC10 que é uma subunidade do complexo APC/C e que por sua vez é um dos reguladores do ciclo mitótico. Além disso, no referido pedido de patente descreve-se um método de crescimento vegetal através da repressão do gene que produz a proteína
15 SAMBA, que é uma proteína que regula a atividade da proteína APC10, que não é a proteína abordada no presente pedido.

[0015] No entanto, nenhuma das invenções citadas chega ao mesmo resultado positivo de produtividade de sementes,
20 aumento de órgãos como folha, caule, raiz, produção de frutos além do aumento da tolerância à seca, tal como alcançado pela presente invenção.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0016] A invenção, que será aqui descrita, é capaz de
25 promover um aumento da biomassa exacerbado do vegetal como um todo, levando a um aumento de biomassa e de produtividade de sementes, sendo visíveis seus efeitos em órgãos como folha, caule, raiz e na produção de frutos. Além disso, a invenção é capaz de aumentar a tolerância à

seca.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017]A Figura 1 revela uma representação esquemática da confirmação da inserção de T-DNA na planta nocaute para AIP10 com a utilização de iniciadores específicos para o T-DNA (LB) e genômico (LP e RP) por PCR. Tamanhos de 1000 pb referente ao controle negativo e de 800 pb para o nocaute com inserção de T-DNA.

[0018]A Figura 2 revela uma representação gráfica da média dos valores encontrados de expressão relativa de AIP10 em plantas AIPko, analisada por qRT-PCR, e normalizada pelos níveis de mRNA do geneUBI14 em em plântulas completas 8 dias após a germinação.

[0019]A Figura 3 (Figura 3A-3E) revela vistas do desenvolvimento das folhas, rosetas e raízes de plantas AIP10ko e plantas selvagens. A Figura 3A revela vistas superiores do desenvolvimento das folhas e rosetas de duas plantas AIP10ko. A Figura 3B revela vistas superiores do desenvolvimento das folhas e rosetas de duas plantas selvagens. A Figura 3C revela uma vista superior do desenvolvimento de uma amostra de folha colhida de uma das duas plantas AIP10ko, amostra esta representativa do tamanho médio das folhas. A figura 3D uma vista superior do desenvolvimento de uma amostra de folha colhida de uma das duas plantas selvagens, amostra esta representativa do tamanho médio das folhas. A Figura 3E revela a diferença fenotípica no desenvolvimento das raízes de uma planta AIP10ko (1) e de uma planta selvagem (2).

[0020]A Figura 4 revela uma representação gráfica

dapesagem, em peso fresco, da roseta de plantas controle e de plantas nocaute para AIP10 (AIP10ko).

[0021]A Figura 5 revela uma representação gráfica da produção de sementes em plantas controle e plantas nocaute para AIP10.

[0022]A Figura 6 revela uma representação gráfica da produção final de síliquis após um período de 7 dias em situação de estresse hídrico de plantas controle e plantas nocaute para AIP10 (AIP10ko).

10 [0023]A Figura 7 revela uma representação gráfica da produção final de síliquis, após um período de 12 dias sob situação de estresse hídrico, de plantas controle e plantas nocaute para AIP10 (AIP10ko).

15 [0024]A Figura 8 revela uma representação gráfica da média dos valores da expressão relativa de AIP10 em folhas da planta RNAi-AIP10, analisada por qRT-PCR, e normalizada pelos níveis de mRNA do gene UBI14, com 30 dias após a germinação e a expressão em plantas selvagem (controle).

[0025]A Figura 9 revela vistas de exemplares de roseta em plantas controle e plantas nocaute para AIP10, com a construção de RNAi com 31 DAG. A Figura 9A revela vistas superiores de exemplares de roseta em plantas controle e plantas nocaute para AIP10 e a Figura 9B revela vistas frontais de exemplares de roseta em plantas controle e plantas nocaute para AIP10.

[0026]A Figura 10 são vistas frontais de plantas controle e plantas nocaute para AIP10, com a construção de RNAi com 30 dias após a germinação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0027]O primeiro aspecto desta invenção é a utilização do gene AIP10, ou uma variante, para aumentar a biomassa e/ou a produtividade das plantas, e para promover a tolerância à seca. O uso deste gene, como aqui indicado, se refere à utilização da proteína e/ou de um ácido nucleico que codifica esta proteína ou o seu complemento.

[0028]O gene inclui, mas não está limitado a, DNA genômico, cDNA, RNA mensageiro (incluindo a região 5' e a região 3' não traduzida) e RNAi.

[0029]O termo "Variantes", como aqui utilizado, compreende, mas não está limitado a, sequências homólogas, ortólogas e parálogas da SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 (proteína AIP10 e sua variante splicing, respectivamente). Sequências homólogas são aquelas sequências que codificam proteínas, enzimas, peptídeos ou oligopeptídeos contendo substituições, deleções e/ou inserções na sequência de aminoácidos, mas que mantêm sua atividade biológica e/ou funcional semelhantes à da proteína inalterada.

[0030]Sequências parálogas são sequências de uma mesma espécie que derivam da duplicação de uma sequência polinucleotídica ancestral e, sequências ortólogas são sequências polinucleotídicas encontradas em espécies diferentes, tendo sido originadas em um processo de especiação a partir de uma sequência polinucleotídica ancestral.

[0031]Preferencialmente, a referida variante homóloga, ortóloga ou paróloga tem uma identidade de sequência ao nível de proteínas de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, de preferência 60%, 61%, 62%, 63%,

64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, mais preferencialmente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, ainda mais preferencialmente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, de preferência mais de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,
5 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais quando comparadas a sequência nº 1, de forma alinhada ou não, através de ferramentas de comparação genômicas usuais, como por exemplo, mas não limitado a, os programas BLASTp, Clustal e COBALT.

10 [0032]O aumento da biomassa da planta e/ou de sua produtividade é medido por comparação com plantas controle, que compreendem um gene utilizado de acordo com a invenção, com a parental não transformada e a planta modificada cultivadas sob as mesmas condições que as da planta
15 controle. O termo produtividade refere-se a uma situação onde apenas uma parte da planta, tecido ou órgão, de preferência uma parte de importância econômica da planta, tal como folha, raiz, fruto ou semente, é aumentada em biomassa.

20 [0033]O termo biomassa refere-se ao aumento da massa de determinada parte vegetal, podendo ser consequência do aumento em área de determinado órgão ou tecido vegetal, ou pode ser consequência do aumento da quantidade dessa parte formada na planta.

25 [0034]O termo "aumento", conforme usado aqui, significa pelo menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ou 10%, de preferência pelo menos 15% ou 20%, mais preferencialmente 25%, 30%, 35% ou 40% ou mais de rendimento e / ou aumento de biomassa em comparação com plantas de controle, tal como aqui definido.

[0035] Nesta invenção, a expressão de AIP10 é reprimida ou completamente eliminada. O termo "Repressão" refere-se à comparação da expressão na planta modificada com a na planta parental não modificada, sendo estas cultivadas sob
5 as mesmas condições, e significa a diminuição ou eliminação dos níveis de mRNA e proteína do alvo ou variantes. A repressão da expressão do gene pode ser realizada, como um exemplo não limitativo, por silenciamento do gene, RNA anti-sentido, por RNAi, microRNA artificial, metodologias
10 de edição de genomas (ZFN - "zinc-finger nucleases", TALENs - "transcription activatorlike effector nuclease", *CRISPR-Cas*, e outros), inserção de T-DNA, transposições e outros.

[0036] Como um exemplo não limitante, o RNAi e o RNA anti-sentido podem ser desenhados com ferramentas
15 disponíveis na internet e serem dirigidos contra uma parte da região 5' terminal não traduzida, contra uma parte da sequência codificante ou toda a sequência codificante, e/ou contra a região 3' terminal do RNAm. Alguns exemplos não limitantes de sequências alvo são: SEQ ID NO: 3, SEQ ID
20 NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19

[0037] Portanto, um aspecto da invenção é a utilização
25 de umRNAi, ou qualquer outro método que leve à diminuição ou eliminação da expressão de um gene, contra um ácido nucleico que codifica AIP10 ou uma variante sua, tal como definido acima, para aumentar a biomassa da planta. O referido RNAi tendo como alvo apenas uma parte do referido

ácido nucleico, em que a sequência alvo pode ser situada na sequência codificante, nas direções 5'ou 3' não traduzidas do referido ácido nucleico que codifica AIP10 ou sua variante.

5 [0038]Outro aspecto da invenção envolve uma planta transgênica, contendo um RNAi contra um ácido nucleico que codifica AIP10 ou umavariante, ou qualquer outro método que leve à diminuição ou eliminação da expressão de AIP10 ou uma variante. Uma planta transgênica, como descrita aqui, é
10 uma planta contendo uma construção de DNA recombinante, em que a referida construção de DNA recombinante pode ser introduzida diretamente por transformação ou indiretamente por endocruzamento. RNAi contra um ácido nucleico que codifica AIP10, ou qualquer outro método que leve à
15 diminuição ou eliminação da expressão de AIP10 ou uma variante, significa que o método é capaz de diminuir ou eliminar a expressão de AIP10 em uma planta selvagem.

[0039]A repressão da expressão do gene alvo pode ser obtida por meio de transferência de uma construção
20 genética. A transferência de ácidos nucleicos externos no genoma de uma planta é chamada de transformação. A transformação de espécies vegetais é uma técnica bastante conhecida para um técnico no assunto. Vantajosamente, qualquer um dos vários métodos de transformação pode ser
25 usado para introduzir o gene de interesse numa célula ancestral adequada.

[0040]Os referidos métodos de transformação e regeneração de plantas a partir de tecidos de plantas ou células vegetais podem ser utilizados para a transformação

transitória ou estável.

[0041] Métodos de transformação incluem, mas não estão limitados a, co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística, eletroporação de protoplastos, "floral dip" e
5 transformação de protoplastos com policações.

[0042] Preferencialmente, as plantas utilizadas nessa invenção são vegetais de interesse comercial e *Arabidopsis thaliana*. Entende-se por vegetais de interesse comercial os vegetais pertencentes às famílias monocotiledôneas,
10 dicotiledôneas e eudicotiledôneas, tradicionalmente empregados na agricultura de larga escala, como por exemplo, os seguintes vegetais: sorgo, cana-de-açúcar, milho, cacão, feijão, arroz, uva, tomate, soja, mandioca, mamona, papaia e populus, mas não estão limitados a estas
15 espécies.

[0043] O método para aumento de biomassa e/ou produtividade vegetal, de acordo com a presente invenção, envolve as etapas de, mas não está limitada a: cultivo da espécie; extração de RNA total e seu tratamento com DNase;
20 síntese de cDNA e clonagem em vetor de expressão em plantas; e transformação e geração de plantas com a construção RNAi AIP10.

Cultivo Vegetal *in vitro* e *in vivo*

[0044] Para a realização do cultivo *in vitro*, *A.*
25 *thaliana* ecotipo Columbia, plantas nocautes para AIP10, obtidas junto ao banco SALK de mutantes de inserção, e plantas RNAi-AIP10 foram primeiramente crescidas em placas de petri com meio MS meia força. Após 14 dias crescendo em placas, as plantas foram transferidas para copos contendo

terra autoclavada e vermiculita (3:1).

[0045] Para a esterilização, as sementes de *A. thaliana*, mantidas a 4°C, foram colocadas em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de etanol a 70% por dois minutos. Após a retirada do etanol, as sementes foram colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% e Tween a 0,025% por 10 minutos. As mesmas foram lavadas cinco vezes com água destilada autoclavada.

[0046] As sementes esterilizadas foram dispostas nas placas com meio de cultura sólido com o auxílio de palitos autoclavados. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 21°C com fotoperíodo de 10 horas de luz e 14 horas de escuro.

[0047] Para a realização do cultivo *in vivo* de *Arabidopsis thaliana*, as plantas foram transferidas para potes contendo terra autoclavada e vermiculita (3:1) após 14 dias crescendo *in vitro* em placas. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 21°C com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. As plantas foram coletadas para análises moleculares e fenotípicas, após tempos variados de cultivo e, em alguns casos, após regimes diferentes de suspensão e retomada da rega com água.

Extração de RNA

[0048] O material vegetal coletado foi imediatamente congelado em Nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C. Para a extração o material foi macerado rapidamente em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão TLE (200 mM Tris-Cl; LiCl 100 mM; EDTA 5 mM; SDS 1%; pH 7,5), 250 µL de fenol e 250 µL de

clorofórmio. Os microtubos foram agitados por 1 min e centrifugados a 12000g por 20 min a 4° C. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para novos microtubos e foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A nova mistura foi agitada por 1 min e centrifugada a 20000g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e foram adicionados 1 volume de LiCl 6M com Dietil-piro-carbonato (DEPC) 0,1%. O tubo foi agitado por 1 min e mantido a 4°C por 16 horas. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 12000g por 20 min a 4° C, o sobrenadante descartado e o precipitado solubilizado em 1 mL de LiCl 3M com DEPC 0,1%. Os tubos foram novamente centrifugados a 12000g por 20 min a 4° C, o sobrenadante descartado e o precipitado solubilizado em 250 µL de H₂O com DEPC 0,1%. A essas amostras foram adicionados 1/10 do volume de NaOAC 3M pH 4,8 com DEPC 0,1% e 2 volumes (considerando a quantidade adicionada de NaOAC) de Etanol absoluto. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 30 min a -80°C ou por 2 h a -20°C. Após a incubação os tubos foram novamente centrifugados a 12000g por 20 min a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de Etanol 70% com DEPC 0,1%. Novamente os tubos foram centrifugados a 12000g por 20 min a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi solubilizado em 20 µL de H₂O com DEPC 0,1%.

Tratamento com DNase

[0049] Os RNAs totais foram tratados com DNase I (New England Biolabs), para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. Foi utilizado 0,5U de DNase I para cada 1µg

de RNA total, no tampão da enzima (200mM Tris-Cl pH 8,3, 500mM KCl, 25mM MgCl₂, 0,1 % DEPC). Os RNAs foram incubados com o tampão e a DNase a 37°C por 15 minutos. O RNA foi purificado pela adição de 1 volume de fenol. As fases foram
5 misturadas por agitação em vortex, e depois centrifugadas a 20000g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1V de clorofórmio. Foi realizada uma nova centrifugação a 20000g por 10 minutos e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O RNA foi
10 então, precipitado, pela adição de 1/10V de NaOAc 3M com 0,1% DEPC e 2V de etanol absoluto, seguido de incubação a -80°C por 20 minutos, e centrifugação a 20000g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com uma solução etanol 70% com 0,1% DEPC, após a
15 qual foi solubilizado em água MilliQ com 0,1% DEPC.

Síntese do cDNA

[0050] Após o tratamento com DNase, a 1ª fita de cDNA das amostras de RNA total foram sintetizadas utilizando a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen). O
20 protocolo a seguir permite a síntese de cDNA com uma reação onde há uma faixa de 10ng a 5µg de RNA total. Foi adicionado, em um microtubo de 0,5mL, 1µL de oligonucleotídeos Oligo (dT)20 (50mM); 10ng - 5µg de RNA total; 1µL de dNTP (10mM) e o volume foi completo com H₂O
25 destilada estéril até 13µL. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e incubada no gelo por 1 minuto. Depois foi adicionado ao microtubo mais 4µL de 5x *First-Strand Buffer*(Tampão de primeira fita); 1µL de DTT (0,1M); 1µL de RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (40U/ µL) e 1µL de

SuperScript III (200U/ μ L). A reação foi incubada a 50°C por 60 minutos e depois inativada a 70°C por 15 minutos. Para remover o RNA restante, 2U de RNase H (USB, Affymetrix) foram adicionadas ao microtubo, e ele foi incubado a 37°C por 15 minutos.

Reações de amplificação - PCR

[0051] As reações de amplificação de AIP10 por PCR foram realizadas em um termociclador MJ- Research (PTC-100), utilizando as seguintes condições:

10 [0052] 94°C por 5 minutos

[0053] 94°C por 1 minuto

[0054] 55°C por 1 minuto

[0055] 72°C por 30 segundos

[0056] 72°C por 5 minutos

15 [0057] As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas por 35 ciclos

[0058] Os seguintes primers foram utilizados para a amplificação:

Attb1 → AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAGAAAGGGGTTGGA

20 Attb2 → AGAAAGCTGGGTTTGTGAGAACTAGCTTAGGGTTC

[0059] Após a amplificação por PCR, os fragmentos gerados foram verificados em gel de agarose 1%. As bandas com fragmentos de DNA no tamanho de interesse foram removidas do gel e colocadas em um tubo de microcentrífuga. O kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system* (Promega) foi utilizado para fazer a purificação dos genes. Após a eluição o DNA foi quantificado usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

[0060] Construção do clone de entrada

[0061] Após a purificação dos fragmentos de interesse do gel de agarose 1%, uma reação de recombinação entre os sítios AttB1 e AttB2 colocados no fragmento através dos oligonucleotídeos e os sítios AttP1 e AttP2 presentes no
5 vetor pDONR221 (Invitrogen) foi realizada. Essa reação, chamada de BP, faz parte da tecnologia Gateway da Invitrogen, e utiliza o kit *Gateway BP Clonase II Enzyme mix*. Para a reação, foram pipetados, em um microtubo de 1,5mL, de 1 a 7µL do produto de PCR purificado do gel de
10 agarose 1%, para uma quantidade final de 15 a 150ng; 1µL do pDONR221 (150ng/µL); 2µL do *BP Clonase II enzyme mix*; e Água MilliQ autoclavada até um volume final de 10µL. As reações foram incubadas a 25°C por 1 hora e, ao final desse tempo, a reação foi parada adicionando-se 1µL de proteinase
15 K e incubando a 37°C por 10 minutos. Após terminada a reação de BP, as amostras foram dialisadas por 3 horas, em membranas de 0,025µm (Millipore).

[0062] **Eletroporação**

[0063] Para a eletroporação, foram utilizadas as
20 alíquotas de 40µl de bactérias eletrocompetentes. A eletroporação foi feita em uma cubeta de eletroporação de 1,8 KV a 200Ω e 25µF em um eletroporador *Eppendorf* como descrito por Ausubel e colaboradores (1992).

[0064] **Clonagem de AIP10 nos vetores de interesse**

25 [0065] Após a formação do clone de entrada, a transferência do AIP10 para outro vetor gateway foi feita através de uma reação de recombinação denominada LR. Nessa reação o gene de interesse é transferido para outros plasmídeos com braços de recombinação ATTR. Essa reação,

também faz parte da tecnologia Gateway da Invitrogen, e utiliza o kit Gateway LR Clonase II Enzyme mix. Para a reação, foram pipetados: 75ng do vetor de destino, 150ng do clone de entrada, 1µL do LR Buffer, 0,5 µL da enzima LR e 5 Água MilliQ autoclavada até um volume final de 5µL. As reações foram incubadas a 25°C por 1 hora. A recombinação foi dialisada durante três horas em membrana 0,025µm (Millipore).

Transformação de *A.thaliana*

10 [0066] *tumefaciens*, contendo o plasmídeo de interesse, foram inoculadas em meio LB sem antibiótico e incubadas a 28°C sob agitação durante oito horas. Após este período, 9 mL de LB sem antibiótico foram adicionados à cultura de bactérias e estas foram incubadas a 28°C sob agitação até 15 atingir a D.O. 2.0 à 600nm. Foram adicionados à cultura de *A. tumefaciens* 40 mL de água milliQ contendo sacarose a 10% e Silwet a 0,05% e esta mistura foi utilizada imediatamente.

[0067] *A. thaliana* germinadas em solo com 20 inflorescências de 7 a 10 cm foram mergulhadas na mistura contendo as bactérias por 2 a 3 segundos de acordo com o protocolo estabelecido (CLOUGH; BENT, 1998). Estas plantas foram cobertas com plástico de PVC e mantidas em um ambiente úmido a 21°C durante 24h. Após este tempo, o 25 plástico foi retirado e as plantas foram mantidas em casa de vegetação nas condições normais de crescimento.

Seleção dos mutantes

[0068] As linhagens de plantas transformadas (T0) tiveram suas sementes coletadas, e foram plaqueadas em meio

seletivo (nos vetores utilizados a seleção foi 50µg/mL de canamicina). As plantas resistentes (T1) foram transferidas para o solo e suas sementes também foram coletadas. As sementes T1 originaram as plantas T2, que foram analisadas
5 quanto à segregação.

Síntese de cDNA para Análise de RT-PCR em tempo real

[0069] A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o kit "*Taqman First strand cDNA synthesis*" e foi feita em reações com volume final de 25µL, de acordo com o
10 fabricante. Para cada 500ng de RNA total foram adicionados 2,5µl de *TaqMan RT Buffer* 10X, 5,5µl de 25mM MgCl₂, 5µl de dNTPs Mix, 1,25µl de Hexamero randômico, 0,5µl de inibidor de RNase, 0,625µl de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50U/µl). As amostras foram incubadas a 25°C por 10
15 minutos, seguidos por 48°C por 30 minutos e um último passo de 95°C por 5 minutos. As amostras foram diluídas quatro vezes com 10mM de Tris-Cl pH 8,0 e armazenadas a -20 °C ou prontamente utilizadas.

Amplificação da molécula de cDNA por RT-PCR em Tempo Real.

20 [0070] As primeiras fitas para as análises de qRT-PCR foram feitas com o kit "*Taqman First Strand cDNA Synthesis*" (Applied Biosystems), em reações com volume final de 25µl, de acordo com o fabricante. Para cada 500ng de RNA total foram adicionados 2,5µl de 10X *Taqman RT Buffer* (tampão),
25 5,5µl de 25mM MgCl₂, 5µl de *deoxyNTPs Mixture*, 1,25µl de oligo dT, 0,5µl de inibidor de RNase, 0,625µl de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50U/µl). A reação foi incubada a 25°C por 10min, seguidos por 48°C por 30min e um último passo de 95°C por 5min. As amostras foram diluídas

quatro vezes com água destilada autoclavada e armazenadas a -20°C.

PCR em tempo real

[0071] O PCR em tempo real foi realizado com o kit
5 *SYBR Green PCR Master Mix*, da empresa Applied Biosystems,
conforme as recomendações do fabricante. A reação foi feita
em uma placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96-Well Reaction
Plate, da empresa Applied Biosystems). Em cada poço foram
colocados 1µl da reação de primeira fita, 5µl da solução
10 mix do kit e 4µl de uma mistura dos dois oligonucleotídeos
a 10mM cada um. Para cada reação que utilizava os
oligonucleotídeos específicos para cada gene, foi feita uma
outra reação com oligonucleotídeos específicos para o gene
Ubiquitina 14 (UBI14), gene constitutivo em todas as
15 células da planta. Esta reação foi utilizada como controle
positivo e como normalizador da quantidade de primeira-fita
de cDNA utilizada nos experimentos. Como controle negativo,
foi feita uma reação nas mesmas condições do controle
positivo sem o molde de primeira fita.

20 [0072] Para normalizar as amostras pela quantidade de
primeira-fita utilizada, o valor da fluorescência de cada
amostra com os oligonucleotídeos específicos dos genes em
questão foi, então, dividido pela fluorescência da amostra
correspondente com ooligonucleotídeo UBI14.

25 **Fl. Rel. = 2^(CT Ubi-CT gene)**

[0073] Onde,

[0074] Fl. Rel. é a fluorescência relativa.

[0075] CT ubi é a média de número de ciclos no ponto
escolhido do controle com Ubi14.

[0076] CT gene é a média de número de ciclos no ponto escolhido do gene em questão.

[0077] Para o cálculo da expressão relativa dos experimentos com os controle experimentais, a seguinte
5 relação foi feita:

Fl. Rel. exp / Fl. Rel. cont

[0078] Os primers (iniciadores) utilizados nos experimentos de PCR em tempo real encontram-se na tabela abaixo:

Primer	Sequência
AIP10 direto	GGAGCTGAAGAACCCTAAGCTAGTT
AIP10 reverso	GGACGAGACAAATCTACAAAAGAATAAA
UBI-14 direto	TCACTGGAAAGACCATTACTCTTGAA
UBI-14 reverso	AGCTGTTTTCCAGCGAAGATG

10 **Biomassa da parte vegetativa**

[0079] Para verificarmos a biomassa das rosetas de *A.thaliana*, plantas controle e nocaute para AIP10 com 27 dias foram coletadas e imediatamente pesadas em balança de precisão. Os valores obtidos foram analisados e
15 estatisticamente considerados diferentes (teste t).

Biomassa e produtividade da parte reprodutiva

[0080] As aferições de altura, produção de siliquas e produtividade de sementes foram feitas com plantas controle e nocaute.

20 [0081] A altura do eixo principal das plantas foi aferida com o auxílio de uma trena e o número de siliquas produzidas foi contado ao longo do desenvolvimento. Os valores obtidos foram analisados e estatisticamente considerados diferentes (teste t).

[0082] A produção de sementes de cada planta foi avaliada individualmente. Após a coleta, o número total de sementes produzido por cada indivíduo foi pesado em balança de precisão e os valores obtidos foram analisados e estatisticamente considerados diferentes (teste t).

Tolerância ao estresse hídrico

[0083] Para a avaliação da tolerância a situações de estresse hídrico, plantas foram cultivadas e regadas normalmente por 25 dias. Em seguida foi suspensa a rega dessas plantas por 7 dias em um grupo e por 12 dias em outro grupo. Ao final desse período a rega foi retomada e após 7 dias foi verificada a taxa de sobrevivência das plantas. Ao final do desenvolvimento foi observado o número de síliquas produzidas por cada indivíduo. Os valores obtidos foram analisados e estatisticamente considerados diferentes (teste t).

Resultados

Aumento de biomassa e produtividade em plantas nocaute para AIP10

[0084] A fim de compreender melhor a função do gene AIP10, foram obtidas, na coleção de mutantes por inserção SALK, plantas nocaute para o gene. A confirmação da inserção do T-DNA foi feita por PCR (figura 1A) e a confirmação da ausência de AIP10 foi feita por qRT-PCR (figura 1B). Para avaliar o efeito do silenciamento da expressão de AIP10 no desenvolvimento de *A. thaliana*, plantas selvagens e nocaute foram crescidas nas condições descritas acima. Na figura 3 podemos observar as diferenças fenotípicas em plantas com níveis reduzidos de AIP10. Essas

plantas possuem folhas maiores na roseta e a raiz mais desenvolvida.

[0085] Com 27 dias após a germinação foram coletadas rosetas de plantas controle e mutantes para aferição do peso fresco (Figura4). Plantas nocaute possuem maior peso fresco do que plantas controle.

[0086] A produção de siliquas e sementes em plantas controle e nocautes para AIP10 também foi quantificada. A quantidade de sementes produzidas por cada planta foi pesada (Figura5) separadamente a fim de quantificar a produtividade das plantas. Plantas nocaute para AIP10 produziram aproximadamente 30% mais sementes do que plantas controle.

Plantas com níveis reduzidos de AIP10 são mais tolerantes ao estresse.

[0087] Plantas selvagens e nocaute para AIP10 foram cultivadas e regadas normalmente até completarem 25 dias. Após esse período um grupo foi submetido ao estresse hídrico por 7 dias e outro por 12 dias. Após esses períodos as plantas voltaram a ser regadas normalmente. Para avaliar a produtividade dessas plantas após o estresse hídrico, o número de siliquas produzidas pelas plantas sobreviventes ao estresse foi avaliado (Figura 6 e 7, respectivamente). Plantas nocaute produziram mais siliquas do que plantas controle.

Estímulo do Aumento da Biomassa Vegetal em Plantas com Níveis Reduzidos de AIP10 (Construção RNAi AIP10)

[0088] Para avaliar o efeito da construção RNAi AIP10 no desenvolvimento de *A.thaliana*, uma planta selvagem

transformada com a construção foi crescida nas condições descritas acima e seu fenótipo foi avaliado. Foi confirmado por qRT-PCR que plantas com a construção possuem níveis reduzidos de AIP10 (figura8).

5 [0089] Como podemos observar na figura 9, plantas com níveis reduzidos de AIP10 (com a construção RNAi) possuem mais folhas do que plantas controle e plantas nocautes para AIP10, bem como folhas maiores. Já na figura 10 podemos observar que plantas com níveis reduzidos de AIP10 são mais
10 altas e possuem mais ramificações.

[0090] Nossos resultados comprovam que a redução dos níveis proteicos de AIP10 é responsável pelo aumento da biomassa e da produtividade vegetal. Assim, diferentes tecnologias podem ser utilizadas como um método para a
15 redução de AIP10. Dentre elas podemos utilizar a inserção de T-DNAs, transposons, microRNA artificial, RNAi, RNA antisense entre outras.

[0091] Muito embora modalidades particulares da presente invenção tenham sido mostradas e descritas, várias
20 combinações, mudanças e modificações podem ser feitas na presente invenção para satisfazer necessidades específicas sem se afastar da invenção nos seus aspectos mais amplos. Além disso, enquanto uma característica particular da invenção pode ter sido divulgada com respeito a apenas uma
25 das várias formas de realização, tal característica pode ser combinada com uma ou mais outras características das outras modalidades, na medida em que pode ser desejado e vantajoso para qualquer aplicação particular.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para promover um aumento da biomassa e produtividade vegetal e da tolerância à seca caracterizado pelo fato de ser através da redução da expressão do gene AIP10 no vegetal e por compreender as seguintes etapas:

Clonagem do AIP10 em vetores de expressão em plantas;

Transformação de uma espécie vegetal e a geração de vegetais com a construção RNAi AIP10; e

Obtenção de vegetais transformados com a construção RNAi.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da referida redução da expressão da proteína AIP10 ser realizada por uma tecnologia de silenciamento do gene, tal como inserção de T-DNA, transposições, RNA anti-sentido, RNAi, microRNA artificial, metodologias de edição de genomas (ZFN - "zinc-finger nucleases", TALENs - "transcription activator like effector nuclease", CRISPR-Cas, e outros), e semelhantes.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o RNAi e o RNA anti-sentido podem ser dirigidos contra uma parte ou toda região 5' terminal não traduzida, e/ou a sequência codificante e/ou a região 3' terminal do RNAm.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a sequência alvo pode ser escolhida dentre: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ

ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, dentre outras.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato da transformação da espécie vegetal ser feita através dos métodos deco-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística, eletroporação de protoplastos, "floral dip", transformação de protoplastos com policátions e semelhantes.

10 6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a referida espécie vegetal é qualquer espécie selecionada dentre: *A. thaliana*, sorgo, cana-de-açúcar, milho, cacao, feijão, arroz, uva, tomate, soja, mandioca, mamona, 15 papaia, populus e semelhantes.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o referido gene AIP10 é constituído pela sequência designada como SEQ ID No 1 ou SEQ ID No 2, ou sua variante.

20 8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida variante de AIP10 é uma variante homóloga, ortóloga ou paróloga e tem uma identidade de sequência ao nível de proteínas de pelo menos 50% a 99% ou mais quando comparadas à SEQ ID No 1 ou SEQ ID 25 No 2.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a referida variante homóloga, ortóloga ou paróloga tem uma identidade de sequência ao nível de proteínas de

preferência 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, , mais preferencialmente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, ainda mais preferencialmente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, de preferência mais
5 de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais quando comparadas a sequência nº 1 quando comparadas à SEQ ID No 1 ou SEQ ID No 2.

10. Uso de AIP10 ou uma variante sua, **caracterizado** pelo fato de ser para promover o aumento da biomassa e
10 produtividade vegetal e para promover a tolerância do vegetal à seca.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a referida AIP10 é constituída pela sequência designada como SEQ ID No 1 ou
15 SEQ ID No 2 ou sua variante.

12. Uso, de acordo com reivindicação 10 ou 11, **caracterizado** pelo fato de que a referida variante é uma variante homóloga, ortóloga ou paróloga de AIP10 e tem uma identidade de sequência ao nível de proteínas de pelo menos
20 50% a 99% ou mais quando comparadas à SEQ ID No 1 ou SEQ ID No 2.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10, 11 ou 12, **caracterizado** pelo fato de que a referida espécie vegetal é qualquer espécie selecionada
25 dentre: A. *thaliana*, sorgo, cana-de-açúcar, milho, cacau, feijão, arroz, uva, tomate, soja, mandioca, mamona, papaia, populus e semelhantes

14. Gene quimérico **caracterizado** pelo fato de ser constituído pela sequência designada como SEQ ID No 1 ou

SEQ ID No 2.

15. Gene quimérico, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de ser usado para a transformação de uma espécie vegetal e promoção do aumento de sua biomassa e produtividade e de sua tolerância à seca.

5

RESUMO

**MÉTODO PARA PROMOVER UM AUMENTO DA BIOMASSA E PRODUTIVIDADE
VEGETAL E DA TOLERÂNCIA À SECA**

5 A presente invenção se refere a um método para
promover um aumento da biomassa de vegetais, e da sua
produtividade. O referido aumento tem seus efeitos visíveis
em órgãos como folha, caule, raiz e na produção de frutos e
sementes. Além disso, a invenção é capaz de aumentar a
10 tolerância dos referidos vegetais à seca.