



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 1 2 0 1 2 0 1 0 2 6 3 B 1 *

(11) BR 112012010263-0 B1

(22) Data do Depósito: 22/10/2010

(45) Data de Concessão: 26/12/2023

(54) Título: MÉTODO PARA CONFERIR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE AO SAL A UMA PLANTA E MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA

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

(30) Prioridade Unionista: 30/10/2009 JP 2009-250524.

(73) Titular(es): TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA.

(72) Inventor(es): SATOSHI KONDO; CHIKARA OHTO; NORIHIRO MITSUKAWA; KENICHI OGAWA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2010006254 de 22/10/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/052169 de 05/05/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2012

(57) Resumo: GENE CAPAZ DE CONFERIR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE AMBIENTAL PARA PLANTAS E MÉTODO PARA A UTILIZAÇÃO DO MESMO. De acordo com a presente invenção, a resistência ao estresse ambiental é transmitida a uma planta ou a resistência ao estresse ambiental de uma planta é melhorada. Pelo menos um gene selecionado a partir dentre o grupo consistindo em um gene LRR-RLP selecionado a partir de um primeiro grupo (incluindo At2g33080), um gene LRR-RLK selecionado a partir de um segundo grupo (incluindo At1g69990), e um gene LRR-RLK selecionado a partir de um terceiro grupo (incluindo At5g39390) é introduzido uma planta, ou uma região de controle de expressão de um gene engógeno é alterada a partir de uma planta.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA CONFERIR RESISTÊNCIA AO ESTRESSE AO SAL A UMA PLANTA E MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA**".

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a uma planta em que um dado gene foi introduzido ou em que uma região de controle da expressão de um gene endógeno tem sido alterada, um método para conferir resistência ao estresse ambiental a uma planta através da introdução de um determinado gene no mesmo ou alterando uma região de controle da expressão de um
10 gene endógeno no mesmo e um método para produzir uma planta para a qual a resistência ao estresse ambiental tenha sido transmitida.

Antecedente da Técnica

A possibilidade de crescimento das plantas depende de diferentes fatores ambientais, tais como temperatura, umidade concentração de sais no
15 solo. Em alguns casos, um ambiente caracterizado por tais fatores é adequado para uma determinada planta, mas não para outras plantas. Em geral, os fatores acima referidos que influenciam o crescimento das plantas são referidos como tensões ambientais. Casos em que uma determinada planta não pode crescer ou está fatalmente danificada em um ambiente
20 caracterizado por meio de certos estresses ambientais são explicados observando que a planta não tem resistência ao estresse ambiental. Por outro lado, os casos em que uma planta que pode crescer em um ambiente caracterizado por meio de certas tensões ambientais são explicados por notar que tal planta tem resistência ao estresse ambiental.

25 As plantas são cultivadas para a finalidade da utilização de alguns tecidos do mesmo (por exemplo, sementes, raízes, folhas ou caules) ou com o propósito de produzir vários materiais, tais como gorduras e óleos. Exemplos de gorduras e óleos produzidos a partir de plantas que têm sido até agora conhecidos incluem o óleo de soja, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo
30 de coco, óleo de arroz, óleo de semente de algodão, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de cártamo, óleo de palma, e óleo de colza. Tais gorduras e óleos são usados extensivamente para aplicações domésticas e indus-

triais. Além disso, as gorduras e óleos produzidos a partir de plantas são utilizadas como matérias-primas para biodiesel ou bioplástico, e a aplicabilidade da mesma é crescente de energia alternativa ao petróleo.

5 Se a resistência ao estresse ambiental pode ser transmitida a uma planta, torna-se possível expandir a área em que a planta pode crescer, permitindo a utilização eficaz do espaço limitado ao chão. Em particular, uma colheita de energia, tais como cana-de-açúcar é utilizada como um material para biocombustível. Portanto, é desejável para a tal cultura de energia obter a resistência a uma variedade de pressões ambientais. Isto quer dizer, se a
10 resistência ao estresse ambiental pode ser transmitida para a cultura de energia acima, a cultura de energia pode ser cultivada em uma área em que a cultura não pode ser cultivada devido aos fatores ambientais descritos acima. As técnicas para conferir resistência ao estresse ambiental para as plantas são descritas nos documentos de patente 1 e 2 e no documento de não
15 Patente 1. O documento de patente 1 descreve um método para conferir resistência ao estresse ao sal a uma planta através da introdução de um gene envolvido na síntese de glicina betaína servindo como uma porção de osmólito para a planta. Tanto o documento da Patente 2 e o Documento de não patente 1 descrevem um método para conferir resistência ao estresse
20 ambiental a uma planta através da introdução de um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora derivada do tabaco na planta.

Além disso, no documento de patente 2 e no documento de não Patente 1, um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora é introduzido. Contudo, estes documentos não descrevem os exemplos de introdução de genes com a utilização de um gene que codifica para uma proteína
25 do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina ou um gene que codifica uma proteína cinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina. Além disso, os documentos de não Patente 2 e 3 descrevem que uma proteína-quinase de tipo receptora tendo uma estrutura
30 de repetições ricas em leucina desempenham um papel importante na reação ao estresse.

Listagem de Citação

Literatura de Patente

PTL 1: Publicação de Patente JP (Kokai) No. 8-266179 A (1996)

PTL 2: Publicação de Patente JP (Kokai) No. 2001-252084 A

PTL 3: Publicação de Patente JP (Kohyo) No. 2007-530063 A

5 Literatura de Não Patente

NPL 1: Plant Physiology, Fevereiro 2003, Vol. 131, pp. 454 a 462

NPL 2: Plant Physiology, Abril 2007, Vol. 113, pp. 1203 a 1212

NPL 3: Plant Cell, Abril 2005, Vol. 17(4), pp. 1105 a 1119

Sumário da Invenção

10 Problema técnico

Nos dias de hoje é praticamente impossível conferir resistência ao estresse ambiental a uma planta através da introdução de um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina ou um gene que codifica uma proteína cinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina na planta.

Por conseguinte, tendo em vista as circunstâncias mencionadas acima, é um objetivo da presente invenção proporcionar uma técnica para a busca de um gene com uma nova função de conferir resistência ao estresse ambiental a uma planta ou a fim de melhorar a resistência ao estresse ambiental de uma planta, permitindo dessa maneira uma resistência ao estresse ambiental a ser transmitido a uma planta ou permitindo que a resistência ao estresse ambiental de uma planta seja melhorado.

Solução do Problema

A fim de atingir o objetivo acima, os presentes inventores descobriram recentemente que a resistência ao estresse ambiental pode ser transmitida a uma planta através da análise de muitas proteínas possuindo estruturas de repetição ricas em leucina e introdução de um gene específico que codifica uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina ou um gene específico que codifica uma proteína cinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina em uma planta ou alterando uma região de controle da expressão de um gene endógeno. Isto levou à conclusão da presente invenção.

De maneira específica, a planta da presente invenção é uma planta em que pelo menos um gene foi introduzido, sendo tal gene selecionado a partir dentre o grupo consistindo em um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina a qual é selecionada a partir de um primeiro grupo (incluindo At5g40170, At2g25440, At2g32680, At3g24900, At3g25020, At3g25010, At2g33020, At2g33080, At2g32660, At2g33050, e At2g33060), um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir de um segundo grupo (incluindo At3g28450, At1g27190, e At1g69990), e um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir de um terceiro grupo (incluindo At3g47570, At3g47580, At3g47090, At3g47110, At5g20480, e At5g39390), ou é uma unidade em que uma região de controle da expressão de um gene endógeno foi alterada.

Além disso, o método para conferir resistência ao estresse ambiental a uma planta da presente invenção compreende a introdução de, pelo menos, um gene selecionado a partir dentre o grupo consistindo em um gene que codifica uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir de um primeiro grupo (incluindo At5g40170, At2g25440, At2g32680, At3g24900, At3g25020, At3g25010, At2g33020, At2g33080, At2g32660, At2g33050, e At2g33060), um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir de um segundo grupo (incluindo At3g28450, At1g27190, e At1g69990), e um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir de um terceiro grupo (incluindo At3g47570, At3g47580, At3g47090, At3g47110, At5g20480, e At5g39390), ou alterando uma região de controle da expressão de um gene endógeno.

Além disso, o método para produzir uma planta da presente invenção compreende as seguintes etapas de: preparar uma planta transformada em que pelo menos um gene foi introduzido, sendo tal gene selecio-

nado a partir dentre o grupo consistindo em um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetição rica em leucina que é selecionada a partir dentre o primeiro grupo (incluindo At5g40170, At2g25440, At2g32680, At3g24900, At3g25020, At3g25010, At2g33020, 5 At2g33080, At2g32660, At2g33050, e At2g33060), um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetição rica em leucina que é selecionada a partir do segundo grupo (incluindo At3g28450, At1g27190, e At1g69990), e um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir do terceiro grupo (incluindo At3g47570, 10 At3g47580, At3g47090, At3g47110, At5g20480, e At5g39390), ou uma planta transformada em que uma região de controle da expressão de um gene endógeno foi alterada; e a avaliação do estresse ambiental quanto à resistência das plantas descendentes da planta transformada e selecionando 15 uma linha com resistência ao estresse ambiental significativamente maior.

Na presente invenção, os exemplos de um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir dentre o primeiro grupo incluem genes especificados pelo At5g40170 e At2g25440 e At2g32680 e At3g24900 e 20 At3g25020 e At3g25010 e At2g33020 e At2g33080 e At2g32660 e At2g33050, e At2g33060 e os genes funcionalmente equivalentes. Especialmente de preferência, um gene selecionado a partir do primeiro grupo é um gene selecionado a partir dentre o grupo consistindo em genes especificados pelo At2g25440 e At2g32680 e At3g24900 e At3g25020 e At3g25010 25 e At2g33020, e At2g33080 e genes funcionalmente equivalentes aos mesmos. Além disso, de preferência, um gene selecionado a partir do primeiro grupo é um gene selecionado a partir dentre o grupo consistindo em genes especificados pelo At2g33020 e At2g33080 e genes respectivos funcionalmente equivalentes.

30 Especialmente de preferência, um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir dentre o primeiro grupo codifica qualquer uma

das seguintes proteínas (a) a (c):

(A) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2;

5 (B) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem uma deleção, uma substituição, uma adição ou uma inserção de um ou uma pluralidade de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2 e tem uma estrutura de repetição rica em leucina e atividade quinase tipo receptora e;

10 (C) uma proteína que é codificada por meio de um polinucleotídeo hibridando sob condições rigorosas a um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos complementares da sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1 e tem uma estrutura de repetições ricas em leucina e atividade quinase tipo receptora.

15 Além disso, os exemplos de um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina selecionada a partir dentre o segundo grupo incluem genes especificados pelo At3g28450 e At1g27190, e At1g69990 e genes funcionalmente equivalente aos mesmos. Especialmente de preferência, os exemplos de um gene selecionado a partir do segundo grupo incluem genes selecionados a partir
20 dentre o grupo consistindo em genes especificados pelo At1g27190 e At1g69990 e genes respectivos funcionalmente equivalentes.

Especialmente de preferência, um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir dentre o segundo grupo é um gene que codifica
25 qualquer uma das seguintes proteínas (a) a (c):

(A) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4;

30 (B) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem uma deleção, uma substituição, uma adição ou uma inserção de um ou uma pluralidade de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 4 e tem uma estrutura de repetição rica em leucina e atividade quinase do tipo receptora; e

(C) uma proteína que é codificada por um polinucleotídeo hibridizando sob condições rigorosas a um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos complementares da sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 3 e tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina e atividade quinase tipo receptora.

Além disso, exemplos de um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir do terceiro grupo incluem genes especificados pelo At3g47570 e At3g47580 e At3g47090 e At3g47110 e At5g20480, e At5g39390 e genes funcionalmente equivalente aos mesmos. Exemplos de uma maneira particular preferíveis de um gene que é selecionado a partir do terceiro grupo incluem genes especificados pelo At3g47110 e At5g20480, e At5g39390 e genes funcionalmente equivalente aos mesmos. Outros exemplos preferíveis de um gene selecionado a partir do terceiro grupo incluem genes especificados pelo At5g20480 e At5g39390 e genes respectivos funcionalmente equivalentes.

Especialmente de preferência, um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina que é selecionada a partir do terceiro grupo é um gene que codifica qualquer uma das seguintes proteínas (a) a (c):

(A) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6;

(B) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem uma deleção, uma substituição, uma adição ou uma inserção de um ou uma pluralidade de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6 e tem uma estrutura de repetição rica em leucina e atividade quinase do tipo receptora; e

(C) uma proteína que é codificada por um polinucleotídeo hibridizando sob condições rigorosas a um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos complementar da sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 5 e tem uma estrutura de repetições ricas em leucina e atividade quinase do tipo receptora.

Exemplos de plantas a serem submetidos no que diz respeito à presente invenção incluem dicotiledóneas, tais como plantas da família *Brassicaceae*. Exemplos de plantas da família *Brassicaceae* incluem *Arabidopsis thaliana* e colza. Outros exemplos de plantas a serem submetidos no que diz respeito à presente invenção incluem monocotiledóneas, tais como plantas da família *Gramineae*. Exemplos de plantas da família *Gramineae* incluem arroz e cana-de-açúcar.

Efeitos vantajosos da Presente Invenção

A planta da presente invenção é uma planta que exibe uma melhoria significativa sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência às tensões ambientais, tais como o estresse ao sal. Além disso, de acordo com o método de difusão de estresse ambiental da presente invenção, uma planta alvo pode exibir uma melhoria significativa sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência ao estresse ambiental. Além disso, de acordo com o método para produzir uma planta da presente invenção, uma planta que apresenta melhoria significativa sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência ao estresse ambiental pode ser produzida. Dessa maneira, por exemplo, com a utilização da presente invenção, as condições de cultivo de plantas podem ser significativamente estendidas, o volume de produção pode ser aumentado quando uma planta por si só é produzida, e os custos de produção de plantas podem ser reduzidos.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é uma fotografia que mostra o estado de germinação ou crescimento (em um meio com uma alta concentração de sal) de plantas transformadas em que um fragmento contendo a ORF de At1g69990 foi introduzido e a qual das plantas do tipo selvagem.

A figura 2 é uma fotografia que mostra o estado de germinação ou crescimento (em um meio com uma alta concentração de sal) de plantas transformadas em que um fragmento contendo a ORF de At5g39390 foi introduzido e a qual de plantas do tipo selvagem.

A figura 3 é uma fotografia que mostra o estado de germinação ou crescimento (em um meio com uma alta concentração de sal) de plantas

transformadas em que um fragmento contendo a ORF de At3g05650 foi introduzido e a qual de plantas do tipo selvagem.

A figura 4 é uma fotografia que mostra o estado de germinação ou crescimento (em um meio com uma alta concentração de sal) de plantas transformadas em que um fragmento contendo a ORF de At2g33080 foi introduzido e a qual de plantas do tipo selvagem.

A figura 5 é uma fotografia que mostra o estado de germinação ou crescimento (em um meio com uma alta concentração de sal) de plantas transformadas em que um fragmento contendo a ORF de At1g71830 foi introduzido e a qual de plantas do tipo selvagem.

Descrição das Modalidades

A seguir, a presente invenção é descrita em detalhe. A planta da presente invenção é uma planta em que um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora (dna presente invenção em diante abreviado como LRR-RLP) tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina, um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora (dna presente invenção em diante abreviado como LRR-RLK) possuindo estruturas de repetição ricas em leucina, ou um gene funcionalmente equivalente ao gene LRR-RLP ou o gene LRR-RLK tenha sido introduzido ou uma unidade em que uma região de controle da expressão de um gene endógeno foi alterada. Esta planta apresenta melhora sobre a planta do tipo selvagem em termos de resistência ao estresse ambiental. O termo "estresse ambiental" utilizado na presente invenção refere-se ao estresse ao salino, estresse de alta temperatura, estresse seco, e similares. Especialmente de preferência, o tipo de resistência transmitido ao estresse ambiental para a planta da presente invenção é a resistência ao estresse ao sal. Isto é, de preferência, a planta da presente invenção exibe melhora sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência ao estresse ao sal. A melhora da resistência às tensões ambientais, tais como o estresse ao sal indica que uma planta pode crescer sob condições em as quais existem tensões ambientais que tornam impossível ou difícil para a planta de tipo selvagem para crescer.

O nível de expressão de um gene alvo pode ser significativa-

mente aumentada para um nível maior do que a da planta do tipo selvagem com a introdução de um gene exógeno alvo para a planta ou a alteração de uma região de controle da expressão de um gene endógeno na planta alvo . Além disso, o gene LRR-RLP, o gene LRR-RLK, ou similares descrito acima, pode ser expresso em todos os tecidos vegetais da planta da presente invenção. Pode também ser expresso em pelo menos alguns dos tecidos das plantas. Na presente invenção, o termo "tecido (s) da planta " se refere ao (s) órgão (s) da planta, tais como folhas, caules, sementes, raízes e flores.

Além disso, o termo "região de controle da expressão" inclui no seu significado uma região promotora para a ligação da RNA polimerase e uma região para a ligação de um fator de transcrição diferente. Para a alteração da região de controle transcricional, é preferível substituir, por exemplo, uma região promotora na região de controle transcricional endógeno com uma região promotora que pode ser mais altamente expressa do que a região do promotor endógeno.

Gene LRR-RLP

De acordo com a presente invenção, o gene LRR-RLP compreende um gene que codifica para uma proteína do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina, que é selecionada a partir dentre o primeiro grupo, incluindo um gene especificado por At5g40170 (referido como o gene At5g40170 (com a mesma aplicação para os seguintes genes)), o gene At2g25440, o gene At2g32680, o gene At3g24900, o gene At3g25020, o gene At3g25010, o gene At2g33020, o gene At2g33080, o gene At2g32660, o gene At2g33050, e o gene At2g33060. Na presente invenção, o termo "primeiro grupo" refere-se a um grupo composto do grupo de genes que pode ser avaliado como sendo funcionalmente equivalente ou idêntico ao gene At2g33080 introduzido em uma planta de uma forma tal que a resistência ao estresse ao sal é melhorada na planta como descrito nos Exemplos a seguir. O grupo de genes que pode ser avaliado como sendo funcionalmente equivalente ou idêntico ao gene At2g33080 pode ser a fim de identificar ou utilizar, por exemplo, a Base de Dados SALADA.

De uma maneira mais específica, para Arabidopsis, exemplos de

genes LRR-RLP incluídos no grupo de 1 são o gene da At5g40170, o gene At2g25440, o gene At2g32680, o gene At3g24900, o gene At3g25020, o gene At3g25010, o gene At2g33020, o gene At2g33080, o gene At2g32660, o gene At2g33050, e o gene At2g33060. De acordo com a presente invenção, pelo menos, um gene selecionado a partir dentre o grupo acima de genes é introduzido ou uma região de controle da expressão de um gene endógeno é alterada. Em particular, um gene alvo para introdução de genes ou a alteração de uma região de controle de expressão da presente invenção é de preferência o gene At2g25440, o gene At2g32680, o gene At3g24900, o gene At3g25020, o gene At3g25010, o gene At2g33020, ou o gene At2g33080, e mais de preferência do gene At2g33020 ou o gene At2g33080. De acordo com a presente invenção, é particularmente preferível para introduzir o gene At2g33080 ou alterar uma região de controle da expressão do gene At2g33080 endógeno.

Como exemplos, a sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene At2g33080 é mostrada na SEQ ID NO: 1 e a sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene At2g33080 é mostrada na SEQ ID NO: 2. Além disso, as sequências de nucleotídeos das regiões codificantes dos genes seguintes são mostradas na SEQ ID NOS: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42, respectivamente: o gene At5g40170, o At2g25440 gene, o gene At2g32680, o gene At3g24900, o gene At3g25020, o gene At3g25010, o gene At2g33020, o gene At2g32660, o gene At2g33050, e o gene At2g33060. As sequências de aminoácidos das proteínas codificadas são mostrados em SEQ ID NOS: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, e 43.

Além disso, de acordo com a presente invenção, um gene funcionalmente equivalente a um gene LRR RLP derivado do *Arabidopsis* descrito acima tal como o gene At2g33080 pode ser introduzido ou uma região de controle da expressão de um gene endógeno pode ser alterada. Na presente invenção, o termo "gene funcionalmente equivalente" refere-se a um gene que codifica LRR-RLP que está incluído no primeiro grupo e é obtido a partir de um organismo não *Arabidopsis*.

O gene funcionalmente equivalente descrito acima não é particularmente limitado. Tal gene pode ser identificado através de pesquisa em uma base de dados contendo sequências de genes de uma variedade de organismos. De maneira específica, por exemplo, a base de dados da sequência de nucleotídeos internacional DDBJ / EMBL / GenBank ou a base de dados SWISS-PROT é pesquisada com o uso da sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1 ou a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 como uma sequência de consulta. Dessa maneira, um gene alvo pode ser prontamente procurado ou identificado na base de dados.

Na presente invenção, o organismo não *Arabidopsis* não é limitado. No entanto, um exemplo disso é o arroz. De maneira específica, um exemplo de um gene funcionalmente equivalente é o gene Os01g0132100 a partir de arroz. Além disso, um exemplo de um gene funcionalmente equivalente a partir de uma planta não-*Arabidopsis* ou de uma planta de não arroz é um gene derivado da repolho (*Brassica oleracea*) (banco de dados UniProt número de acesso. ACB59218). A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene Os01g0132100 é mostrada na SEQ ID NO: 7. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrada na SEQ ID NO: 8. A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene ACB59218 é mostrada na SEQ ID NO: 9. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrada na SEQ ID NO: 10.

Além disso, de acordo com a presente invenção, um gene LRR-RLP não está limitado aos genes LRR- RLP descritos acima que compreendem as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 1, 7, 9, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42 e que codifica as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 2, 8, 10, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, e 43. Dessa maneira, o gene LRR-RLP pode ser um gene que contém uma sequência de aminoácidos que possui uma supressão, uma substituição, uma adição ou uma inserção de um ou uma pluralidade de aminoácidos que diz respeito às sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID

NOS: 2, 8, 10, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, e 43, e funciona como um gene LRR-RLP. Na presente invenção, o termo "uma pluralidade de aminoácidos" refere-se a 1 a 20, de preferência 1 a 10, mais de preferência 1 a 7, mais de preferência de 1 a 5, especialmente de preferência de 1 a 3 aminoácidos, por exemplo. Além disso, a supressão de aminoácidos, substituição ou adição pode ser realizada alterando uma sequência de nucleotídeos que codifica o gene LRR-RLP acima por meio de uma técnica conhecida na literatura. A mutação pode ser introduzida a partir de uma sequência de nucleotídeos por meio de uma técnica conhecida, tais como o método de Kunkel ou o método duplex intervalado ou um método baseado da mesma. Por exemplo, a mutação é introduzida com um kit de mutagênese utilizando mutagênese dirigida ao local (por exemplo, mutante-K ou mutante-G (ambos são nomes comerciais de TAKARA Bio)) ou similar, ou um kit da série de PCR LA Mutagênese *in vitro* (comércio nome, TAKARA Bio). Além disso, um método de mutagênese pode ser: um método utilizando um agente de mutação química representado por meio de EMS (acetato de metanossulfonato), 5-bromouracila, 2-aminopurina, hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N nitrosoguanidina, ou outros compostos cancerígenos; ou um método que envolve o tratamento de radiação ou o tratamento ultravioleta [UV] tipicamente utilizando raios X, raios alfa, raios beta, raios gama, um feixe de íons, ou similares.

Além disso, os genes LRR-RLP podem ser genes homólogos aos Genes LRR-RLP que compreendem as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 1, 7 e 9 e que codifica as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 2, 8, 10, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 e 43. Na presente invenção, o termo "gene homólogo" refere-se, de uma maneira geral, a um gene que tem ramificado de uma maneira evolutiva a partir de um gene ancestral comum, incluindo um gene homólogo (ortólogo) de 2 tipos de espécies e um gene homólogo (parólogo) gerado por meio da sobreposição de ramificação que tem lugar dentro da mesma espécie. Em outras palavras, o referido termo "gene funcionalmente equivalente" refere-se a um gene homólogo, tal como um ortólogo ou um parólogo. Além disso, o referido termo "gene funcionalmente equivalente" também pode se re-

ferir a um gene que não evolui a partir de um gene comum, mas simplesmente tem funções análogas.

Os exemplos de genes com funções similares a dos genes LRR-RLP compreendendo as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 1, 7, 9, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42 e que codifica as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 2, 8, 10, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, e 43 incluem genes que codificam proteínas com sequências de aminoácidos que têm 70% ou mais, de preferência 80% ou mais, mais de preferência 90% ou mais, e mais de preferência 95% ou mais semelhança com estas sequências de aminoácidos e com atividade LRR-RLP. Na presente invenção, o valor de similaridade refere-se a um valor que pode ser encontrado com base na configuração padrão usando um computador montado com um BLAST (Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico) do programa e um banco de dados contendo informações a partir da sequência de genes.

Além disso, os genes com funções similares a dos genes LRR-RLP compreendendo as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 1, 7, 9, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42 e que codifica as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 2, 8, 10, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, e 43 podem ser identificados, quando a informação do genoma de plantas permanece sem esclarecimento, por meio da extração do genoma de uma planta alvo ou a construção de uma biblioteca de cDNA para uma planta alvo e, em seguida, isolando uma região genômica ou de cDNA hibridizando sob condições rigorosas para pelo menos algumas porções dos genes LRR-RLP compreendendo as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 1, 7, 9, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42. Na presente invenção, o termo "condições rigorosas" refere-se a condições em que a saber um híbrido específico é formado, mas um híbrido não específico nunca é formado. Por exemplo, tais condições incluem hibridação a 45 graus C com 6 x SSC (citrato de sódio / cloreto de sódio), seguido de lavagem a 50 graus C a 65 graus C com 0,2-1 x SSC e SDS a 0,1 %. De uma maneira alternativa, tais condições incluem hibridação a 65 graus C a

70 graus C com 1 x SSC, seguida por meio da lavagem em 65 graus C a 70 graus C com 0,3 x SSC. A hibridação pode ser realizada por meio de um método convencional conhecido como um método descrito em J. Sambrook e outros Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Gene LRR-RLK

De acordo com a presente invenção, um gene LRR-RLK compreende um gene que codifica para uma quinase do tipo receptora tendo uma estrutura de repetições ricas em leucina e é selecionado a partir dentre o segundo grupo, incluindo o gene At3g28450, o gene At1g27190, e o gene At1g69990 ou o terceiro grupo incluindo o gene At3g47570, o gene At3g47580, o gene At3g47090, o gene At3g47110, o gene At5g20480, e o gene At5g39390.

Na presente invenção, o "segundo grupo" refere-se a um grupo composto do grupo de genes que pode ser avaliado como sendo funcionalmente equivalente ou idêntico ao gene At1g69990 introduzido em uma planta de uma forma tal que a resistência ao estresse ao sal pode ser melhorada na planta tal como descrito nos Exemplos a seguir. Além disso, o "terceiro grupo" refere-se a um grupo composto do grupo de genes que pode ser avaliado como sendo funcionalmente equivalente ou idêntico ao gene Ag5g39390 introduzido em uma planta de uma forma tal que a resistência ao estresse ao sal é melhorada na planta tal como descrito nos Exemplos a seguir. O grupo de genes que pode ser avaliado como sendo funcionalmente equivalente ou idêntico ao gene At1g69990 ou o gene Ag5g39390 podem ser pesquisados para identificar ou utilizar, por exemplo, a Base de Dados SALADA.

De uma maneira mais específica, exemplos de genes LRR-RLK que estão incluídos no segundo grupo para *Arabidopsis* são o gene da At3g28450, o gene At1g27190, e o gene At1g69990. De acordo com a presente invenção, pelo menos, um gene selecionado a partir dentre o grupo acima de genes é introduzido ou uma região de controle da expressão de um gene endógeno é alterada. Em particular, um gene alvo para introdução

de genes ou a alteração de uma região de controle de expressão é de preferência o gene At1g27190 ou o gene At1g69990. De acordo com a presente invenção, é particularmente preferível para introduzir o gene At1g69990 ou alterar uma região de controle da expressão do gene At1g69990 endógeno.

5 Como exemplos, a sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene At1g69990 é mostrada na SEQ ID NO: 3 e a sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene At1g69990 é mostrada na SEQ ID NO: 4.

De uma maneira mais específica, exemplos de Genes LRR-RLP que são incluídos no grupo de 3 para *Arabidopsis* são o gene da At3g47570, o gene At3g47580, o gene At3g47090, o gene At3g47110, o gene At5g20480, e o gene At5g39390. De acordo com a presente invenção, pelo menos, um gene selecionado a partir dentre o grupo acima de genes é introduzido ou a região de controle da expressão de um gene endógeno é modificado. Em particular, um gene alvo para introdução de genes ou a alteração de uma região de controle de expressão é de preferência o gene At3g47110, o gene At5g20480, ou o gene At5g39390, e mais de preferência do gene At5g20480 ou o gene At5g39390. De acordo com a presente invenção, é particularmente preferível para introduzir o gene At5g39390 ou alterar uma região de controle da expressão do gene At5g39390 endógeno.

20 Como exemplos, a sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene At5g39390 é mostrada na SEQ ID NO: 5 e a sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene At5g39390 é mostrada na SEQ ID NO: 6.

25 Além disso, de acordo com a presente invenção, um gene funcionalmente equivalente a um gene LRR RLK derivado do *Arabidopsis* descrito acima, tais como o gene At1g69990 ou o gene At5g39390 podem ser introduzidos ou uma região de controle da expressão de um gene endógeno pode ser alterada. Na presente invenção, o termo "gene funcionalmente equivalente" refere-se a um gene que codifica LRR-RLK que está incluído no segundo grupo ou no terceiro grupo, e é obtido a partir de um organismo não *Arabidopsis*.

30

O gene funcionalmente equivalente descrito acima não é particularmente limitado. Tal gene pode ser identificado através de pesquisa em uma base de dados contendo sequências de genes de uma variedade de organismos. De maneira específica, por exemplo, a base de dados da sequência de nucleotídeos internacional DDBJ / EMBL / GenBank ou a base de dados SWISS-PROT é pesquisada com o uso da sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 3 ou 5, ou a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 4 ou 6, como uma sequência de pesquisa. Dessa maneira, um gene alvo pode ser prontamente procurado ou identificado na base de dados.

Na presente invenção, o organismo não *Arabidopsis* não é limitado. No entanto, um exemplo disso é o arroz. De maneira específica, um exemplo de um gene funcionalmente equivalente do gene é o gene At1g69990 Os04g0487200 a partir de arroz. Além disso, exemplos de genes funcionalmente equivalentes do gene At1g69990 a partir de plantas não *Arabidopsis* ou de não arroz incluem um gene derivado do Abeto Sitka (*Picea sitchensis*) (Base de Dados UniProt número de acesso ABR16721.) e um gene derivado da videira Europeia (*Vitis vinifera*) (Base de Dados UniProt número de acesso CAO14859).

A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene Os04g0487200 é mostrada na SEQ ID NO: 11. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrada na SEQ ID NO: 12. A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene ABR16721 é mostrada na SEQ ID NO: 13. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrada na SEQ ID NO: 14. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio da região de codificação do gene CAO14859 é mostrada na SEQ ID NO: 15.

Além disso, os exemplos dos genes funcionalmente equivalentes descritos acima do gene At5g39390 incluem o gene Os02g0215700 e o gene 02g0215500 a partir de arroz. Além disso, exemplos de genes funcionalmente equivalentes do gene At5g39390 a partir de uma planta não *Arabidopsis* ou de não arroz incluem os genes derivados de videira Europeia (*Vitis*

vinifera) (Base de Dados UniProt número de acesso CAN83822 e CAO41339).

5 A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene Os02g0215700 é mostrada na SEQ ID NO: 16. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrado na SEQ ID NO: 17. A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene Os02g0215500 é mostrada na SEQ ID NO: 18. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrado na SEQ ID NO: 19. A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene CAN83822 é mostrada na SEQ ID NO: 20. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrada na SEQ ID NO: 21. A sequência de nucleotídeos da região de codificação do gene CAO41339 é mostrada na SEQ ID NO: 22. A sequência de aminoácidos de uma proteína codificada por meio do gene é mostrada na SEQ ID NO: 23.

15 Além disso, de acordo com a presente invenção, um gene LRR-RLK não está limitado aos genes LRR-RLK descritos acima que compreendem as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 3, 5, 11, 13, 16, 18, 20, e 22 e que codifica as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 4, 6, 12, 14, 15, 17, 19, 21 e 23. Dessa maneira, o gene LRR-RLK pode ser um gene que contém uma sequência de aminoácidos que possui uma supressão, uma substituição, uma adição ou uma inserção de um ou uma pluralidade de aminoácidos que diz respeito às sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 4, 6, 12, 14, 15, 17, 19, 21 e 23, e funciona como um gene LRR-RLK. Na presente invenção, o termo "uma pluralidade de aminoácidos" refere-se a 1 a 20, de preferência 1 a 10, mais de preferência 1 a 7, mais de preferência de 1 a 5, especialmente de preferência de 1 a 3 aminoácidos, por exemplo. Além disso, a supressão, substituição ou adição de aminoácidos, pode ser realizada por meio da alteração de uma sequência de nucleotídeos que codifica o gene LRR RLK acima por meio de uma técnica conhecida na literatura. Isto quer dizer, o método descrito no parágrafo sobre o "gene LRR-RLP" descrito acima pode ser usado.

20

25

30

Além disso, um gene LRR-RLK pode ser um gene homólogo descrito no parágrafo acima a respeito do "gene LRR-RLP." Exemplos de um gene LRR-RLK incluem genes que codificam as proteínas com sequências de aminoácidos que têm 70 % ou mais, de preferência 80 % ou mais, mais de preferência 90 % ou mais, e mais de preferência 95 % ou mais de similaridade com as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID: 4, 6, 12, 14, 15, 17, 19, 21 e 23 e tendo atividade LRR-RLK. Na presente invenção, a palavra "semelhança" tem o mesmo significado descrito no parágrafo acima sobre o "gene LRR-RLP."

10 Além disso, como descrito no parágrafo acima a respeito do "gene LRR-RLP," um gene LRR-RLK pode ser identificado através da extração do genoma de uma planta alvo ou por meio da construção de uma biblioteca de cDNA para uma planta alvo e isolando uma região genômica ou de CDNA que hibrida sob condições rigorosas para pelo menos algumas porções dos genes LRR-RLK compreendendo as sequências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID NOS: 3, 5, 11, 13, 16, 18, 20, e 22. Na presente invenção, o termo "condições estritas" tem o mesmo significado descrito no parágrafo acima sobre o "gene LRR-RLP."

A planta da presente invenção é uma planta que exibe uma melhoria significativa sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência às tensões ambientais, tais como o estresse ao sal com a introdução de um gene LRR-RLP incluídos no primeiro grupo, um gene LRR-RLK incluídos no segundo grupo, ou um gene LRR-RLK incluídos no terceiro grupo ou a alteração de uma região de controle da expressão de um gene endógeno. Um exemplo de uma técnica para a introdução de genes, tais em uma planta é uma técnica para a introdução de um vetor de expressão no qual um gene exógeno descrito acima é arranjado sob controle de um promotor que permite a expressão na planta. Um exemplo de uma técnica para alterar uma região de controle da expressão de um gene endógeno é uma técnica para alterar um promotor para um gene endógeno em uma planta alvo.

Um exemplo preferido é uma técnica para a introdução de um vetor de expressão em que o gene está disposto acima sob o controle de um

promotor que permite a expressão em uma planta alvo.

Vetor de expressão

Um vetor de expressão é construído de modo a conter um promotor que permite a expressão dentro de uma planta e do Gene LRR-RLP descrito acima ou do gene LRR-RLK. Como um vetor que serve como um corpo mãe para um vetor de expressão, vários vetores convencionalmente conhecidos podem ser usados. Por exemplo, os plasmídeos, os fagos, cosmídeos, ou similares, podem ser utilizados e tal vetor pode ser adequadamente selecionado dependendo das células da planta em que é introduzido e os métodos de introdução. Os exemplos específicos de tais vetores incluem pBR322, pBR325, pUC19, pUC119, pBluescript, pBluescriptSK e vetores PBI. De uma maneira particular, quando um método para a introdução de um vetor em uma planta utiliza *Agrobacterium*, um vetor binário pBI é de preferência utilizado. Exemplos específicos de tais vetor binário pBI incluem pBIG, pBIN19, pBI101, pBI121 e pBI221.

Um promotor a ser utilizado na presente invenção não é particularmente limitado, desde que o mesmo permita a expressão do gene descrito acima em uma planta. Qualquer promotor conhecido pode ser utilizado de uma maneira adequada. Exemplos de tal promotor incluem um promotor do vírus do mosaico da repolho-flor 35S (CaMV35S), os promotores de genes diferentes de atina, promotores de vários gene da ubiquitina, um promotor do gene da nopalina-sintetase, um promotor do gene do tabaco PR1a, um promotor do gene de ribulose de subunidade pequena de 1,5 bifosfato carboxilase-oxidase de tomate, e um promotor do gene napin. Destes, um promotor do vírus do mosaico da repolho-flor 35S, um promotor do gene da atina, ou um promotor do gene da ubiquitina pode ser mais de preferência utilizado. A utilização de cada um dos promotores acima permite uma forte expressão de qualquer gene quando é introduzido em células de plantas.

Além disso, um promotor com funções que causam a expressão de local específico em uma planta também pode ser utilizado na presente invenção. Como tal promotor, qualquer promotor convencionalmente conhecido pode ser usado. Quando o gene descrito acima é expresso de maneira

específica em um local utilizando o tal promotor, uma planta em que o gene acima é expresso no seu órgão exibe melhoria sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência ao estresse ambiental.

Além disso, um vetor de expressão pode conter ainda outros
5 segmentos de DNA em adição a um promotor e o gene acima. Tais outros segmentos de DNA não são particularmente limitados e os seus exemplos incluem um terminador, um marcador de seleção, um potenciador, e uma sequência de nucleotídeos para aumentar a eficiência da tradução. Além disso, o vetor de expressão recombinante acima pode ainda ter uma região
10 de T-DNA. Uma região de T-DNA pode aumentar a eficiência para a introdução do genem particular quando o vetor de expressão recombinante acima é introduzido uma planta usando *Agrobacterium*.

Um terminador de transcrição não é particularmente limitado, contanto que tem uma função como um local de terminação da transcrição e
15 pode ser qualquer terminador de transcrição conhecido. Por exemplo, de maneira específica, uma região de terminação da transcrição (terminador Nos) de um gene da nopalina-sintase, uma região de terminação da transcrição (terminador CaMV35S) de 35S do vírus de mosaico de repolho-flor, ou similar, pode ser de preferência utilizado. Destes, o terminador NOS pode
20 ser mais de preferência utilizado. No caso de o vetor recombinante acima, um fenômeno de tal modo que uma transcrição desnecessariamente longa é sintetizada e que um promotor forte diminui o número de cópias de um plasmídeo após introdução em células de plantas pode ser prevenido por arranjar um terminador de transcrição em uma posição apropriada.

25 Como um marcador de seleção de transformantes, um gene de resistência ao fármaco pode ser usado, por exemplo. Os exemplos específicos de gene de resistência, tais fármacos incluem genes de resistência aos fármacos contra a higromicina, bleomicina, canamicina, gentamicina, cloranfenicol, e similares. Plantas transformadas podem ser facilmente selecionadas por meio da seleção de plantas que podem crescer em um meio contendo os antibióticos acima.
30

Um exemplo de uma sequência de nucleotídeos para aumentar

a eficiência da tradução é uma sequência ômega a partir do vírus do mosaico do tabaco. Esta sequência ômega é arranjada em uma região não traduzida (5'UTR) de um promotor, de modo que a eficiência de tradução do gene de fusão pode ser aumentada. Como tal, o vetor de expressão recombinante
5 pode conter diferentes segmentos de DNA dependendo das finalidades.

Um método para a construção de um vetor de expressão recombinante não é particularmente limitado. Para um vetor adequadamente selecionada servindo como um corpo mãe, o promotor e o gene acima referido, e, se necessário, os outros segmentos de DNA acima podem ser introduzi-
10 dos em uma ordem predeterminada. Por exemplo, o gene acima e um promotor (e, se necessário, um terminador de transcrição ou similares) estão ligados a fim de construir uma cassete de expressão e, em seguida, o cassette pode ser introduzido em um vetor. Na construção de um cassette de expressão, por exemplo, os locais de clivagem de segmentos de DNA são pre-
15 parados a fim de terem extremidades salientes complementares um do outro e depois realizam uma reação com uma enzima de ligação, tornando possível para especificar a ordem dos segmentos de DNA. Além disso, quando um cassette de expressão contém um terminador, os segmentos de DNA podem ser dispostos na seguinte ordem de quantidade: um promotor, o gene
20 acima, e um terminador. Além disso, os reagentes para a construção de um vetor de expressão (isto é, os tipos de enzimas de restrição, enzimas de ligação, e outros similares) também não são particularmente limitados. Dessa maneira, os reagentes comercialmente disponíveis podem ser adequadamente selecionados e utilizados.

25 Além disso, um método para a replicação (um método para a produção) do vetor de expressão acima não é particularmente limitado e métodos de replicação convencionais conhecidos podem ser utilizados na presente invenções. Em geral, tais vetores de expressão, podem ser replicados dentro de *Escherichia coli* como hospedeiro. Neste momento, os tipos preferidos de *Escherichia coli* podem ser selecionados dependendo dos tipos de
30 vetores.

Transformação

O vetor de expressão descrito acima é introduzido em uma planta alvo por meio de um método de transformação em geral. Um método para a introdução de um vetor de expressão em células da planta (método de transformação) não é particularmente limitado. Os métodos de introdução
5 apropriados convencionalmente conhecidos podem ser utilizadas dependendo células da planta. De maneira específica, um método utilizando *Agrobacterium* ou um método que envolve a introdução direta de células da planta podem, por exemplo, serem usados. Como um método utilizando *Agrobacterium*, um método descrito em Bechtold, E., Ellis, J. e Pelletier, G. (1993) In
10 Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis* plants. C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie, 316, 1194 a 1199, ou um método descrito em Zyprian E, Kado CI, *Agrobacterium*-mediated plant transformation by novel mini-T vectors in conjunction with a high-copy *vir* region helper plasmid, *Plant Molecular Biology*, 1990, 15 (2), 245 a 256 pode ser,
15 por exemplo, empregado.

Como um método para a introdução de uma maneira direta de um vetor de expressão em células de plantas, microinjeção, electroporação, um método de polietileno glicol, um método de arma de partículas, fusão de protoplastos, um método de fosfato de cálcio, ou similar, podem ser empregados.
20

Além disso, quando um método para a introdução de uma maneira direta de DNA nas células da planta é empregue, o DNA que pode ser utilizado na presente invenção contém unidades transcricionais necessárias para a expressão de um gene alvo, tal como um promotor e um terminador
25 de transcrição, e um gene alvo. As funções do vetor não são essenciais em tal caso. Além disso, um DNA que contém uma região de codificação de proteína sozinha de um gene alvo não tendo qualquer unidade transcricional pode ser utilizado na presente invenção, contanto que está integrado na unidade transcricional de um hospedeiro e, em seguida, o gene alvo pode ser
30 expresso.

Exemplos de células da planta em que o vetor de expressão acima ou um cassete de expressão contendo nenhum vetor de expressão,

mas um gene alvo é introduzido incluem células de cada tecido dos órgãos das plantas tais como flores, folhas e raízes, caules, e a suspensão de cultura de células. Neste momento, um vetor de expressão adequado pode ser construído de acordo com os tipos de planta a serem produzidos ou um vetor de expressão versátil pode ser construído com antecedência e, em seguida, introduzido em células de plantas.

As plantas em que um vetor de expressão é introduzido ou em outras palavras, as plantas que são melhoradas a fim de terem resistência ao estresse ambiental não são particularmente limitadas. De maneira específica, qualquer planta pode ser esperada em ter efeitos de melhoria de resistência ao estresse ambiental por meio da indução da expressão dos genes acima. Os exemplos de plantas alvo incluem, mas não estão limitados a, dicotiledóneas e monocotiledóneas, tais como as plantas (vide abaixo) que pertencem às famílias *Brassicaceae*, *Gramineae*, *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Salicaceae*, e similares.

Família *Brassicaceae*: *Arabidopsis thaliana*, colza (*Brassica rapa*, *Brassica napus*, *Brassica campestris*), repolho (*Brassica oleracea var capitata*), Napa (*Brassica rapa var pekinensis*), Ging-geng-cai (*Brassica rapa var chinensis*), Nabo (*Brassica rapa var. rapa*), nabiço (*Brassica rapa var. hakabura*), mostarda potherb (*Brassica rapa var. lancinifolia*), Komatsuna (*Brassica rapa var. peruviridis*), pak choi (*Brassica rapa var. chinensis*), daikon (*Raphanus sativus*), rábano silvestre japonês (*wasabia japonica*), e similares.

Família *Solanaceae*: tabaco (*Nicotiana tabacum*), berinjela (*Solanum melongena*), batata (*Solaneum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon lycopersicum*), pimenta fresca (*Capsicum annuum*), Acacia, e similares.

Família *Leguminosae*: soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*), fava (*Vicia faba*), Wisteria (*Wisteria floribunda*), amendoim (*Arachis hypogaea*), pé de ave (*Lotus corniculatus var japonicus*), Feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão azuki (*Vigna angularis*), acácia, e similares.

Família *Asteraceae*: margaridas floristas (*Chrysanthemum morifolium*), girassol (*Helianthus annuus*), e similares.

Família *Arecaceae*: óleo de palma (*Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), coco (*Cocos nucifera*), tamareira (*Phoenix dactylifera*), Copernicia, e similares.

5 Família *Anacardiaceae*: cera de árvore (*Rhus succedâneos*), castanha de caju (*Anacardium occidentale*), árvore de laca (*vernicifluum Toxicodendron*), mangueira (*Mangifera indica*), pistache (*Pistacia vera*), e similares.

10 Família *Cucurbitaceae*: abóbora (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo*), pepino (*Cucumis sativus*), cobra cabaça (*Trichosanthes cucumeroides*), cabaça (*Lagenaria siceraria var gourda.*), e similares.

Família *Rosaceae*: amêndoa (*Amygdalus communis*), rosa (*Rosa*), morango (*Fragaria*), cereja (*Prunus*), maçã (*Malus pumila var domestica.*), e similares.

15 Família *Caryophyllaceae*: cravo (*Dianthus caryophyllus*) e similares.

Família *Salicaceae*: choupo (*Populus trichocarpa*, *Populus nigra*, ou *Populus tremula*) e similares.

20 Família *Gramineae*: milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), bambu (*Phyllostachys*), cana (*Saccharum officinarum*), capim napier (*Pennisetum puppureum*), Erianthus (*Erianthus ravenae*), miscanthus (grama prata japonesa) (*Miscanthus virgatum*), sorgo (*Sorghum*) e grama transgênica (*Panicum*), e similares.

Família *Liliaceae*: tulipa (*Tulipa*), lírio (*Lilium*), e similares.

25 Um destes exemplos, as culturas de energia, tais como milho, cana-de-açúcar, colza, girassol e, o que pode servir como matérias-primas para biocombustível, podem ser alvos preferidos. É possível estender significativamente as áreas de cultivo e as condições de cultura para uma cultura de energia relevante através da melhoria da resistência ao estresse ambiental da cultura de energia. De maneira específica, torna-se possível cultivar as

30 culturas de energia, mesmo em áreas em que as plantas de tipo selvagem não podem crescer sob a influência dos fatores ambientais (por exemplo, a temperatura média, a concentração de sal no solo, etc.) Dessa maneira, os

custos de biocombustíveis, como o bioetanol, o biodiesel, o biometanol, bi-oDME, bioGTL (BTL), e biobutanol podem ser reduzidos.

Além disso, como descrito acima, Genes LRR-RLP e genes LRR-RLK que podem ser usados na presente invenção podem ser isolados e utilizados a partir de várias plantas. Tais genes LRR-RLP e genes LRR-RLK podem ser adequadamente selecionados e usados, dependendo dos tipos de plantas alvo a fim de serem melhorados em termos de resistência ao estresse ambiental. De maneira específica, quando uma planta alvo é uma monocotiledônea, um gene LRR-RLP ou um gene LRR-RLK que foi isolado a partir de uma monocotiledônea é de preferência introduzido. Em particular, quando uma planta alvo é o arroz, o Gene LRR-RLP derivado de arroz (SEQ ID NO: 7) ou gene LRR-RLK (SEQ ID NO: 11, 16 ou 18) é de preferência introduzido.

Além disso, na presente invenção, mesmo quando uma planta alvo é uma monocotiledônea, um gene LRR-RLP derivado do gene dicotiledôneo ou LRR-RLK pode ser introduzida. De maneira específica, por exemplo, um Gene LRR-RLP derivado de *Arabidopsis thaliana* ou gene LRR-RLK pode ser introduzido não só em dicotiledôneos, mas também uma variedade de plantas que são classificadas como monocotiledôneas.

20 Outras etapas e métodos

Após a transformação acima, uma etapa de seleção de transformantes apropriados a partir de plantas pode ser realizada por meio de um método convencional conhecido. Tal método de seleção não é particularmente limitado. Por exemplo, a seleção pode ser feita com base na resistência ao fármaco, tais como resistência à higromicina. A resistência ao estresse de uma maneira alternativa, após o crescimento dos transformantes, um transformante tendo significativamente melhorado a resistência ao estresse ambiental na sua totalidade ou em seu órgão arbitrário ou tecido pode ser selecionado.

30 Também, as plantas descendentes, podem ser obtidas a partir de plantas transformadas obtidas por meio da transformação de acordo com um método convencional. As plantas de progenitura retendo um traço no

qual o Gene LRR-RLP ou o gene LRR-RLK que foi introduzido são selecionadas com base na resistência ao estresse ambiental. Portanto, uma linha de planta estável, capaz de exibir resistência ao estresse ambiental melhorada devido a ter a característica acima pode ser produzida. Além disso, as células da planta ou materiais reprodutivos, tais como as sementes, frutas, 5 ações, calosidades, tubérculos, as orelhas de corte, ou protuberâncias, podem ser obtidas a partir de uma planta transformada ou uma planta prole do mesmo. Uma linha de planta estável, capaz de exibir resistência ao estresse ambiental melhorada devido a ter a característica acima pode ser produzida em massa com base a partir daí nos tais materiais. 10

Além disso, a planta da presente invenção pode incluir uma matéria compreendendo, pelo menos, qualquer um de uma planta adulta, as células de plantas, tecido de planta, caules, e sementes. Isto é, de acordo com a presente invenção, qualquer matéria em um estado que permite que 15 eventualmente haja crescimento a fim de se tornar uma planta pode ser considerada como uma planta. Além disso, as células da planta incluem células de plantas em várias formas. Exemplos de células da planta incluem suspensão de cultura de células, protoplastos, e seções de folhas. Como resultado da proliferação / diferenciação de células de plantas deste tipo, uma 20 planta pode ser obtida. Além disso, uma planta pode ser reproduzida a partir de células de plantas através de um método convencionalmente conhecido, dependendo dos tipos de células da planta.

Como descrito acima, de acordo com a presente invenção, é possível proporcionar uma planta que exibe melhoria sobre a planta do tipo selvagem, em termos de resistência às tensões ambientais, tais como o estresse ao sal com a introdução de um gene LRR-RLP ou um gene LRR-RLK 25 ou a alteração de uma região de controle da expressão de um gene endógeno a partir daí.

Exemplos

30 A presente invenção é a seguir descrita em maior detalhe com referência aos exemplos seguintes, embora o âmbito técnico da presente invenção não é limitado aos mesmos.

Exemplo 1 1. Materiais e métodos

1-1. Materiais experimentais

Como materiais experimentais, as sementes de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (marca de ativação das linhagens de T-DNA: linhagens Weigel T-DNS, em um total de 20072 linhagens) foram utilizadas. Além disso, as sementes foram adquiridas a partir de Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Em relação às sementes utilizadas como materiais experimentais, Weigel, D., e outros, *Plant Physiol.*, 122, 1003 a 1013 (2000) pode ser referido.

10 1-2. Métodos

1-2-1. Seleção de mutantes resistentes ao sal

As sementes de linhagens de T-DNA Weigel foram assepticamente semeadas em NaCl a 125 mM ou 150 mM contendo ágar MS modificado (1 %) do meio [vitaminas em meio B5, 10 g de sacarose / l, e 8 g de ágar / l (por meio de bactérias; Wako Puré Chemical Industries, Ltd.)] e depois cultivadas a 22 graus C sob iluminação de 30 a 100 micromol/m²/sec (um ciclo de 16 horas nas horas de luz / 8 no escuro). Duas a quatro semanas após a sementeira, os candidatos mutantes resistentes ao sal foram selecionados. Além disso, em relação ao meio MS, vide Murashige, T. e outros (1962) *Physiol. Planta.*, 15, 473 a 497. Além disso, em relação ao meio B5, vide Gamborg, OL e outros (1968) *Experimental Cell Research*, 50, 151 a 158.

1-2-2. Preparação de DNA

Um local de inserção do T-DNA no genoma da linhagem de *Arabidopsis thaliana* resistente ao sal dessa maneira selecionado foi determinado por meio de um método TAIL-PCR. Primeiro, as folhas jovens foram colhidos a partir das plantas cultivadas de *Arabidopsis thaliana* e, em seguida, esmagadas sob o congelamento com nitrogênio líquido. O DNA foi preparado usando um kit de preparação de DNA (DNeasy Planta Mini Kit, QIAGEN) de acordo com os protocolos padrão incluídos com o kit.

1-2-3. Método TAIL-PCR e presunção de local de inserção de T-DNA

Três (3) tipos de iniciadores específicos, TL1, TL2 e TL3, foram

determinados a serem localizados perto da sequência do T-DNA esquerda (T-DNA da fronteira esquerda) de um vetor de ativação de marcação (pS-KI015: GenBank Número de Acesso No. AF187951) utilizado nas linhagens T-DNA Weigel. Com a utilização de um iniciador arbitrário P1 e as soluções de reação seguintes PCR e condições de reação, TAIL-PCR (supervisores, Isao Shimamoto e Takuji Sasaki, New Edition, Plant PCR Experimental Protocols, 2000, pp 83-89, Shujunsha, Tóquio, Japão; Genomics 25, 674 a 681, 1995; Plant J., 8, 457-463, 1995) foi realizada, de modo que o DNA genômico adjacente ao T-DNA foi amplificado.

10 As sequências específicas dos iniciadores TL1, TL2 e TL3, e P1 são como se segue.

TL1: 5'-TGC TTT CGC CAT TAA ATA GCG ACG G-3' (SEQ ID NO: 44)

TL2: 5'-CGC TGC GGA CAT CTA CAT TTT TG-3' (SEQ ID NO: 45)

TL3: 5'-TCC CGG ACA TGA AGC CAT TTA C-3'(SEQ ID NO: 46)

15 P1: 5'-NGT CGA SWG ANA WGA A-3' (SEQ ID NO: 47)

Além disso, na SEQ ID NO: 47, "n" representa "a", "g", "c", ou "t" (localização: 1 e 11), "s" representa "g" ou "c" (localização: 7), e "w" representa "a" ou "t" (localização: 8 e 13).

20 As condições de reação e a composição da primeira solução de reação PCR são apresentados na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1

Modelo (DNA genômico)	:	10 ng
10 x tampão PCR (Takara Bio)	:	2 Microlitros
2,5 mM dNTPs (Takara Bio)	:	1,6 Microlitros
Primeiro iniciador específico (TL1: SEQ ID NO: 44)	:	0,5 pmol
Iniciador arbitrário P1 (SEQ ID NO: 47)	:	100 pmol
TaKaRa Ex Taq (Takara Bio)	:	1,0 unidade
Total		20 Microlitros

Tabela 2

#1: 94 graus C (30 segundos) / 95 graus C (30 segundos)

2: 5 ciclos de 94 graus C (30 segundos) / 65 graus C (30 segundos) / 72 graus C (1 minuto)

25 # 3: 1 ciclo de 94 graus C (30 segundos) / 25 graus C (1 minuto) - aumentado para 72 graus C dentro de 3 minutos / 72 graus C (3 minutos)

□# 4: 94 graus C (15 segundos) / 65 graus C (30 segundos) / 72 graus C (1 minuto)
 94 graus C (15 segundos) / 68 graus C (30 segundos) / 72 graus C (1 minuto), e
 15 ciclos de 94 graus C (15 segundos) / 44 graus C (30 segundos) / 72 graus C (1
 minuto)

5 # 5: 72 graus C (3 minutos)

As condições de reação e a composição da segunda solução de reação PCR são apresentados na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3

Modelo (50 vezes de diluição do 1º produto de PCR)	:	1 Microlitro
10 x tampão PCR (Takara Bio)	:	2 Microlitros
2,5 mM dNTPs (Takara Bio)	:	1,5 Microlitros
Segundo iniciador específico (TL2: SEQ ID NO: 45)	:	5 pmol
Iniciador arbitrário P1 (SEQ ID NO: 47)	:	100 pmol
TaKaRa Ex Taq (Takara Bio)	:	0,8 unidade
Total		20 Microlitros

Tabela 4

10 # 5: 94 graus C (15 segundos) / 64 graus C (30 segundos) / 72 graus C (1
 minuto)
 94 graus C (15 segundos) / 64 graus C (30 segundos) / 72 graus C (1
 minuto), e
 12 ciclos de 94 graus C (15 segundos) / 44 graus C (30 segundos) /
 15 72 graus C (1 minuto)
 # 6: 72 graus C (5 minutos)

As condições de reação e a composição da terceira solução de reação PCR são apresentados na Tabela 5 e Tabela 6, respectivamente.

Tabela 5

Modelo (50 vezes de diluição do 2º produto de PCR)	:	1 Microlitros
10 x tampão PCR (Takara Bio)	:	5 Microlitros
2,5 mM dNTPs (Takara Bio)	:	0,5 Microlitros
Terceiro iniciador específico (TL2: SEQ ID NO: 46)	:	10 pmol
Iniciador arbitrário P1 (SEQ ID NO: 47)	:	100 pmol
TaKaRa Ex Taq (Takara Bio)	:	1,5 unidade
Total		50 Microlitros

20 Tabela 6

#7 20 ciclos de 94 graus C (30 segundos) / 44 graus C (30 segundos)/72
 graus C (1 minuto)
 # 5: 72 graus C (3 minutos)

Subsequentemente, os produtos da 2ª e 3ª reação foram submetidos a electroforese em gel de agarose, em seguida, a presença ou a ausência de amplificação e da especificidade dos produtos de reação foram confirmadas. Além disso, os produtos da 3ª amplificação foram submetidos a uma reação de sequenciação diretamente utilizando um kit de sequencia-
5 mento do Ciclo terminador BigDye. Vide. 3. 1 (Applied Biosystems) e o iniciador específico TL3. Dessa maneira, uma sequência de nucleotídeos foi determinada utilizando um Analizador Genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

10 Como resultado, 5 diferentes sequências de nucleotídeos foram determinados. De maneira específica, a informação da sequência 538 pb, a informação da sequência 311-bp, a informação da sequência 498 pb, a informação da sequência 633-bp, e a informação da sequência 245-bp foram obtidas. As sequências obtidas são mostradas nas SEQ ID NOS: 48 a 52.

15 O recurso de informações de Arabidopsis (TAIR: <http://www.arabidopsis.org/~V>) foi submetido a uma pesquisa BLAST com a utilização da informação da sequência obtida. Dessa maneira, os locais de T-DNA de inserção foram encontrados a existir, na seguinte ordem: um local entre o gene de cromossoma Arabidopsis 1 [Código AGI (código genético de Iniciativa de Genoma Arabidopsis): At1g69990] e o gene [AGI (cromossoma Arabidopsis 1 [Código AGI (código): At1g70000]; um local do gene de cromossoma Arabidopsis 5 [Código AGI (código genético de Iniciativa de Genoma Arabidopsis): At5g39400]; um local do gene de cromossoma Arabidopsis 3 [Código AGI (código genético de Iniciativa de Genoma Arabidopsis):
20 At3g05630]; um local do gene de cromossoma Arabidopsis 2 [Código AGI (código genético de Iniciativa de Genoma Arabidopsis): At2g33110], e um local entre o gene de cromossoma Arabidopsis 1 [Código AGI (código genético de Iniciativa de Genoma Arabidopsi): At1g71810] e o gene [Código AGI (código genético de Iniciativa de Genoma Arabidopsi): At1g71820].

30 1-2-4. Predição de genes ativados

Genes ativados foram previstos com base nas sequências de genes presumíveis do quadro de leitura aberta (ORF) existentes dentro de

faixas de 10-Kb perto dos respectivos locais de T-DNA de inserção (o local entre At1g69990 e At1g70000, o local de At5g39400, o local de At3g05630, o local de At2g33110, eo local entre At1g71810 e At1g71820) descrito em 1-2-3. acima.

5 1-2-5. Obtenção de genes preditos

Para a amplificação de fragmentos que contêm as regiões de ORF do gene LRR-RLK (proteína quinase do tipo receptora de repetição rica em leucina) (At1g69990), o gene LRR-RLK (proteína quinase do tipo receptora de repetição rica em leucina) (At5g39390), o LRR (repetição rica em leucina) do gene da proteína (At3g05650), e o gene da proteína LRR (repetição rica em leucina) (At2g33080) que tinha sido previsto para ser ativado em 1-2-4, um par de iniciadores de PCR foram desenhados e sintetizados para cada fragmento com base na informação da sequência descrita no TAIR (<http://www.arabidopsis.org/home.html>) (tabela 7). Além disso, estes iniciadores foram concebidos, de modo que um local de enzima de restrição necessários para introdução em vetores de expressão foi adicionado a cada iniciador (tabela 7).

Tabela 7

Gene	Avançado	Reversa	Local de restrição da enzima	
At1g69990	5'-ACG CGT CGA CCC ATC ATG AAA ACG ATC TCA ATC TTC TTC GTC-3' (SEQ ID NO: 53)	5'-TGT ACA TGT ACA AGT GAG AAC GGT AGA TAA GTA AGT GG-3' (SEQ ID NO: 54)	Sal I	BsrG I
At5g39390	5'-ACG CGT CGA CCA AAC GAC GTA TCT CAT AAG TCG ACG CA-3' (SEQ ID NO: 55)	5'-TGT ACA TGT ACA GGA GAA GTT TGA AGA TCA TCG AGA GG-3' (SEQ ID NO: 56)	Sal I	BsrG I
At3g05650	5'-ACG CGT CGA CCC ATC ACA CAC ACA TAC ACA CAC-3' (SEQ ID NO: 57)	5'-TGT ACA TGT ACA CAG CGT AAA TGA AGA ACA CCC CAA ACT GAA C-3' (SEQ ID NO: 58)	Sal I	BsrG I
At2g33080	5'-ACG CGT CGA CAT GTC AGG ATC ACA TCT GCG TTT GC-3' (SEQ ID NO: 59)	5'-TGT ACA TGT ACA TCA GCA CTT GCT CCT GTT CTT CG-3' (SEQ ID NO: 60)	Sal I	BsrG I

A fim de amplificar um fragmento contendo a região ORF do gene LRR-RLK (proteína quinase do tipo receptora de repetição rica em leucina) (At1g71830), três pares de iniciadores foram desenhados e sintetizados com base na informação da sequência descrita em TAIR (<http://www.arabidopsis.org/home.html>) (tabela 8). Na presente invenção, o conjunto de iniciadores (Avançado 1 e Reverso3) foram concebidos de modo que um local de enzima de restrição necessário para introdução em vetores

de expressão foi adicionado a cada iniciador (tabela 8).

Tabela 8

Gene	Avançado	Reversa	Local de restrição da enzima	
Atlg71830	Avançado 1 5'-ACG CGT CGA CAT GGA GTC GAG TTA TGT GGT G-3' (SEQ ID NO: 61)	Reversa 1 5'-CCG GAA TAG GAC CCG AGA AGCTG-3' (SEQ ID NO: 62)	Sal I	
	Avançado 2 5'-CAG CTT CTC CGG TCC TAT TCC GG-3' (SEQ ID NO: 63)	Reversa 2 5'-CAT CAC TCG CGA CTT GTA GCT CCC GC-3' (SEQ ID NO: 64)		
	Avançado 3 5'-GCG GGA GCT ACA AGT GGC GAG TGA TC-3' (SEQ ID NO: 65)	Reversa 3 5'-TGT ACA TGT ACA GTA GGA AAA CAG CCG AGT-3' (SEQ ID NO: 66)		BsrG I

De acordo com o método descrito no 1-2-2, um modelo de DNA foi preparado a partir de tipo selvagem de *Arabidopsis thaliana* (eco-tipo Col-0). Takara Ex Taq (Takara Bio Inc.) e platina DNA Polymerase PFX (Invitrogen) ou Fusão da polimerase de DNA de alta-fidelidade (New England Bio-Labs: NEB) foram utilizados como enzimas e um par de iniciadores listados na Tabela 7 foram utilizados como iniciadores. Para a composição de solução da reação de PCR e as condições de reação, os protocolos ligados a cada enzima foram referidos. Além disso, para o gene LRR-RLK (At1g71830), por PCR foi realizado usando os três pares de iniciadores listados na Tabela 8 e Polimerase Platinum DNA PFX (Invitrogen) como uma enzima tal que os três pares de produtos de amplificação por PCR foram obtidos. Os produtos de amplificação de PCR foram sujeitos a electroforese com 2 % de gel de agarose (tampão TAE) e, em seguida, os fragmentos foram corados com brometo de etídio. Um gel contendo fragmentos alvo foi excisado usando um bisturi. Os fragmentos de DNA alvo foram eluídos e purificados usando GFX PCR de DNA e um kit de purificação GEL Band (Amersham). A sobreposição de PCR foi realizada com o uso dos três fragmentos de DNA como modelos e Avançado 1 e reverso 3 como iniciadores.

Como no caso acima, cada produto de amplificação de PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose, seguido por meio da excisão e purificação. Adenin foi adicionada ao fragmento de DNA dessa maneira obtido utilizando um Kit de Adição A (QIAGEN). O DNA amplificado ao qual tinha sido adicionado adenina foi ligado a um vetor TA Cloning-pCR2.1 usando um Kit de Clonagem TA TOPO (Invitrogen) e, em seguida, transformado

as células competentes (*E. coli* TOP 10) incluídas com o kit. Após transformação, as células foram cultivadas em meio LB suplementado com 50 microlitros/canamicina ml e, em seguida, os transformantes foram selecionados. As colônias que apareceram foram submetidas a cultura líquida em meio LB suplementado com 50 microlitros/canamicina ml. O DNA de plasmídeo foi preparado a partir dos microrganismos dessa maneira obtidos usando um kit de mini plasmídeo (QIAGEN).

Um fragmento contendo a ORF do gene LRR-RLK (At1g69990), um fragmento contendo a ORF do gene LRR-RLK (At5g39390), um fragmento contendo a ORF do gene da proteína LRR (At3g05650), um fragmento contendo a ORF do gene da proteína LRR (At2g33080), e um fragmento contendo a ORF do gene LRR-RLK (At1g71830) foram separadamente clonados em vetores, seguido por meio da determinação da sequência de nucleotídeos e análise de sequência.

15 1-2-6. Construção de vetores de expressão de plantas

Os fragmentos contendo ORFs do gene LRR-RLK (At1g69990), o gene LRR-RLK (At5g39390), o gene da proteína LRR (At3g05650), o gene da proteína LRR (At2g33080), e o gene LRR-RLK (At1g71830) foram inseridos no um vetor de expressão de plantas pBI121 contendo uma sequência de ômega do vírus do mosaico do tabaco. Dessa maneira, as construções foram preparadas.

Em primeiro lugar, o vetor pCR2.1, em que um fragmento contendo a ORF do gene LRR-RLK (At1g69990) tinha sido clonado em 1-2-5, foi tratada com as enzimas de restrição ao Sal I e BsrG I.

25 Em seguida, de forma similar pBI121 contendo uma sequência de ômega foi tratado com as enzimas de restrição Sal I e BsrG I. Os produtos digeridos com estas enzimas de restrição foram submetidos a electroforese em 0,8% gel de agarose. Um fragmento de aproximadamente 1850 pb, contendo a ORF do gene LRR-RLK (At1g69990) e pBI121 contendo a sequência de ômega foram cada fracionados e purificados a partir do gel utilizando GFX PCR de DNA e um kit de purificação GEL Band (Amersham).

30 Para a introdução de um fragmento contendo a ORF do gene

LRR-RLK (At1g69990) usando um fragmento contendo a sequência de ômega pBI121 como um vetor, o vetor e o inserto foram misturados em uma proporção de 1: 10, seguido por meio de uma reação de ligação durante a noite à 16 graus C usando uma quantidade equivalente de um Kit de Ligação Takara Vide. 2 (Takara Bio Inc.).

A quantidade total da solução reacional foi adicionada a 100 microlitros de células competentes a (cepa de E. coli DH5 alfa, Toyobo), de modo que a transformação foi realizada de acordo com protocolos incluídos com o kit. As células foram aplicadas ao meio LB ágar contendo 50 microgramas/ml de canamicina então cultivadas durante a noite. As colônias que apareceram foram submetidas a cultura líquida em meio LB suplementado com 50 microgramas/ml de canamicina. O DNA de plasmídeo foi preparado a partir dos microrganismos dessa maneira obtidos usando um kit de mini plasmídeo (QIAGEN).

O fragmento dessa maneira obtido, contendo a ORF do gene LRR-RLK (At1g69990) foi subclonado em um vetor de expressão, seguido por meio da determinação da sequência de nucleotídeos e análise de sequência.

O gene LRR-RLK (At5g39390), o gene da proteína LRR (At2g33080), e o gene LRR-RLK (At1g71830) foram incorporados em vetores de expressão, da maneira descrita acima, seguido por meio da determinação da sequência de nucleotídeos e análise de sequência. O gene da proteína LRR (At3g05650) foi clonado em um vetor de clonagem TA -pCR2.1, tratado com uma enzima de restrição ao sal I e extremidades de embotamento com um DNA de um kit de embotamento (Takara Bio Inc.), seguido por meio do tratamento com clorofórmio fenol e depois com uma enzima de restrição BsrG I. Do mesmo modo, pBI121 contendo a sequência de ômega foi tratada com uma enzima de restrição ao Sal I e extremidades de embotamento com um DNA de um kit de embotamento (Takara Bio Inc.), seguido por meio do tratamento com clorofórmio fenol e depois com uma enzima de restrição BsrG I. Cada gene foi incorporado em um vetor de expressão, da maneira descrita acima, seguido por meio da determinação da sequência de

nucleotídeos e por meio da análise de sequência.

1-2-7. Introdução de genes em *Arabidopsis thaliana* utilizando o método de *Agrobacterium*

O vetor de expressão construído em planta 1-2-6 foi introduzido
5 na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 por meio da electroporação
(Plant Molecular Biology Manual, Second Edition, BG Stanton, AS Robbert,
Kluwer Publishers Academic, 1994). Subsequentemente, *Agrobacterium tu-*
mefaciens em que o vetor de expressão de plantas tinha sido introduzido foi
introduzido no *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (eco-tipo Cl-0), por
10 meio de um método descrito por meio da infiltração Clough e outros (Plant
J., 16, 735 a 743, 1998).

Os transformantes foram selecionados usando o meio contendo.
Instalações de geração T2 foram produzidas por autopolinização a partir dos
transformantes.

15 1-2-8. Confirmação do fenótipo de transformante

Teste de resistência ao sal:

As sementes preparadas no 1-2-7. e as sementes de uma planta
Arabidopsis não recombinante do tipo selvagem usadas como um controle
foram assepticamente semeadas em um meio de ágar modificado MS, con-
20 tendo NaCl a 150 mM. Elas foram cultivadas sob condições de 22 graus C e
16 horas nas horas de luz / 8 no escuro, e com uma intensidade de luz que
varia entre cerca de 30 a 45 micro E/cm².

2. Resultados

As Figuras 1 a 5 mostram fotografias de placas, contendo plan-
25 tas transformadas em fragmentos que contém as ORFs do gene do tipo sel-
vagem, o gene LRR-RLK (At1g69990), o gene LRR-RLK (At5g39390), o ge-
ne LRR-RLP (At3g05650), o gene LRR-RLP (At2g33080), e o gene LRR-
RLK (At1g71830) foram separadamente introduzidos, cada fotografia indi-
cando os resultados de resistência ao sal do ensaio descrito no 1-2-8. acima.
30 As figuras 1, 2 e 4 mostram que as plantas transformadas em que fragmen-
tos contendo as ORFs do gene LRR-RLK (At1g69990), o gene LRR-RLK
(At5g39390), e o gene LRR-RLP (At2g33080) as quais tinham sido introdu-

zidas germinaram e cresceram em um meio com uma alta concentração de sal. Os resultados descreveram que as plantas transformadas apresentaram uma melhora sobre a planta do tipo selvagem em termos de resistência ao sal.

- 5 No entanto, como mostrado nas figuras 3 e 5, as plantas transformadas em fragmentos que contém as ORFs do gene LRR-RLP (At3g05650) e o gene LRR-RLK (At1g71830) as quais tinham sido introduzidas não exibiram resistência ao sal claramente melhorada.

REVINDICAÇÕES

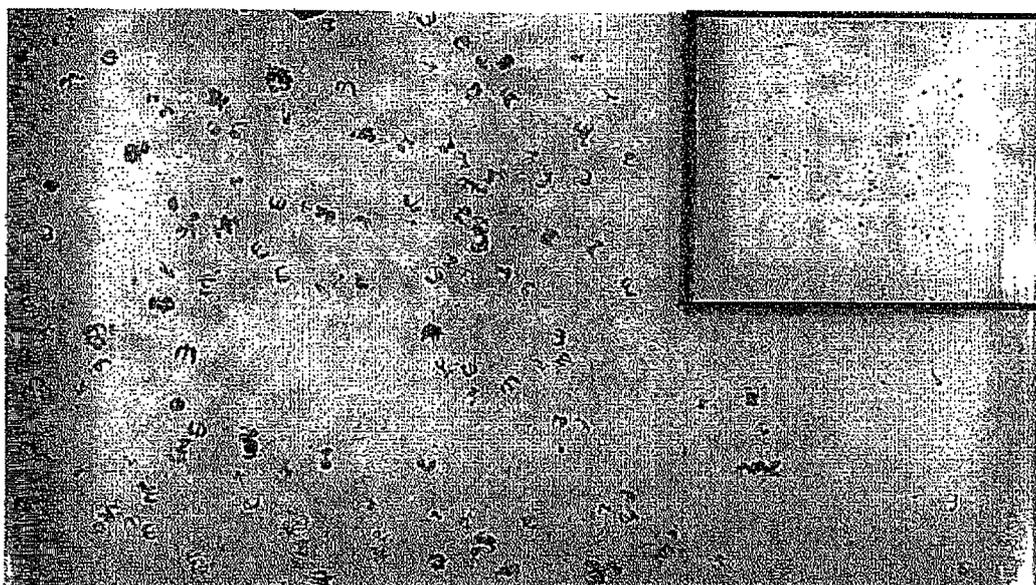
1. Método para conferir resistência ao estresse ao sal a uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende a introdução de pelo menos um gene, em que o gene consiste em uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID No:1 ou uma sequência de nucleotídeo degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos.

2. Método para produzir uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

preparação de uma planta transformada na qual pelo menos um gene foi introduzido, em que o gene consiste em uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID No:1 ou uma sequência de nucleotídeo degenerada da mesma codificando a mesma sequência de aminoácidos; e

avaliação da resistência ao estresse ao sal das plantas descendentes da planta transformada a fim de selecionar uma linhagem com resistência ao estresse ao sal significativamente maior quando comparada com a planta do tipo selvagem.

FIG. 1

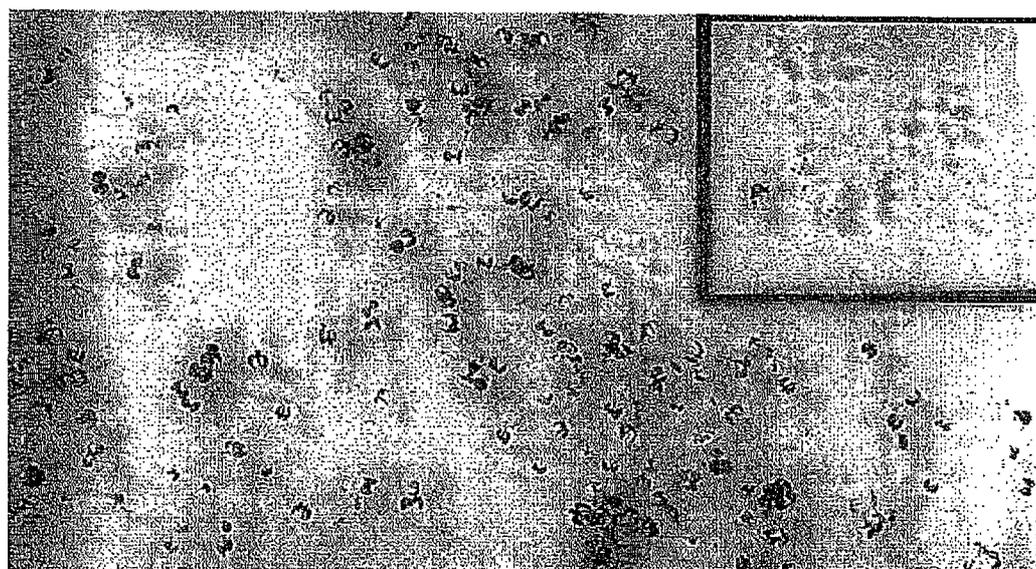


Plantas transformadas
(*Arabidopsis thaliana*
transformada a partir do
gene LRR-RLK)

Plantas do tipo selvagem
(*Arabidopsis thaliana*)
mostradas na estrutura

Teste de Resistência ao sal para *Arabidopsis thaliana* transformada a partir
do gene LRR – RLK (At1g69990)

FIG. 2



Plantas transformadas
(*Arabidopsis thaliana*
transformada a partir do
gene LRR-RLK)

Plantas do tipo selvagem
(*Arabidopsis thaliana*)
mostradas na estrutura

Teste de Resistência ao sal para *Arabidopsis thaliana* transformada a
partir do gene LRR – RLK (At5g39390)

FIG. 3

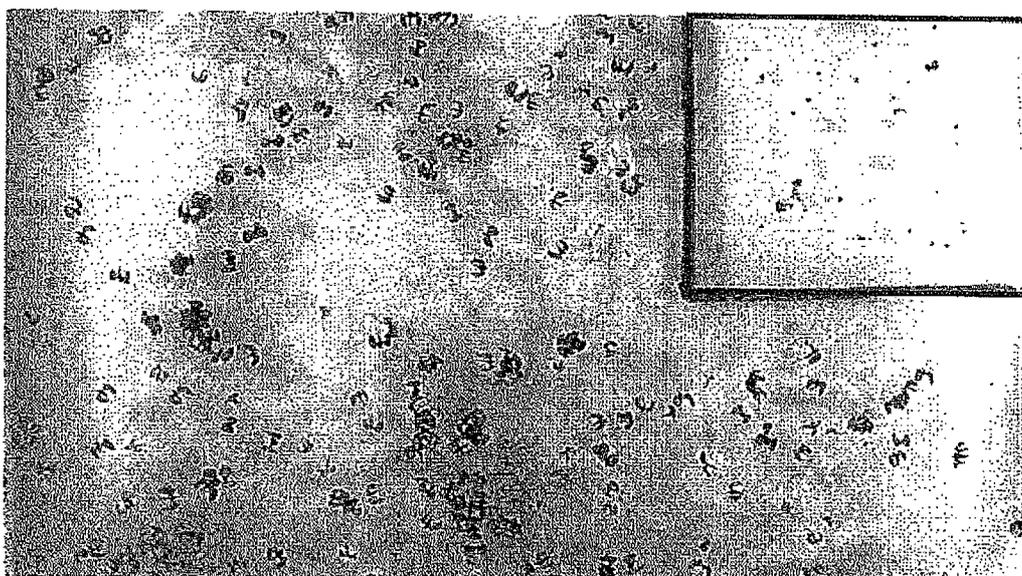


Plantas transformadas
(*Arabidopsis thaliana*
transformada a partir do
gene LRR-RLK)

Plantas do tipo selvagem
(*Arabidopsis thaliana*)
mostradas na estrutura

Teste de Resistência ao sal para *Arabidopsis thaliana*
transformada a partir do gene LRR (t3g05650)

FIG. 4

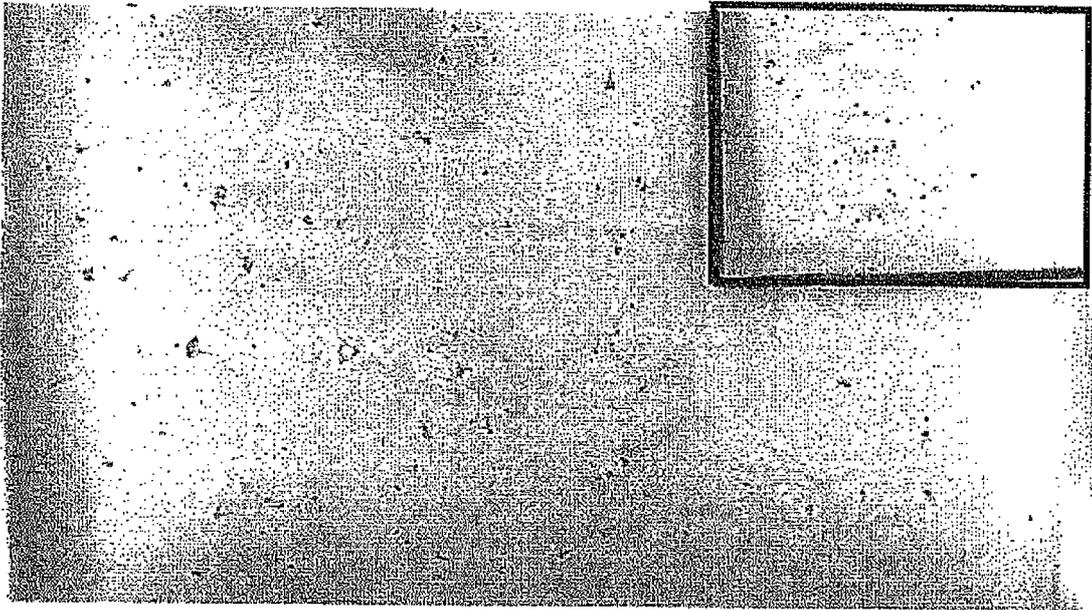


Plantas transformadas
(*Arabidopsis thaliana*
transformada a partir do
gene LRR-RLK)

Plantas do tipo selvagem
(*Arabidopsis thaliana*)
mostradas na estrutura

Teste de Resistência ao sal para *Arabidopsis thaliana* transformada
a partir do gene LRR (At2g33080)

FIG. 5



Plantas transformadas
(*Arabidopsis thaliana*
transformada a partir do
gene LRR-RLK)

Plantas do tipo selvagem
(*Arabidopsis thaliana*)
mostradas na estrutura

Teste de Resistência ao sal para *Arabidopsis thaliana* transformada a
partir do gene LRR-RLK (At1g71830)