



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

(21) BR 102019008855-9 A2



(22) Data do Depósito: 30/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

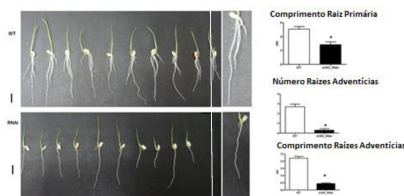
**(54) Título:** USO DA FAMÍLIA DE GENES E DAS PROTEÍNAS ABCISIC ACID STRESS AND RIPENING (ASR), PROCESSO, MELHORAMENTO GENÉTICO, PLANTA TRANSGÊNICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA E PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA A BAIXOS NÍVEIS DE FOSFATO

**(51) Int. Cl.:** A01H 1/00; C12N 15/82; C12N 15/29; A01H 5/00.

**(71) Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

**(72) Inventor(es):** MARCIA MARIA AUXILIADORA NASCHENVENG PINHEIRO MARGIS; FELIPE DOS SANTOS MARASCHIN; BRENO XAVIER GONÇALVES.

**(57) Resumo:** USO DA FAMÍLIA DE GENES E DAS PROTEÍNAS ABCISIC ACID STRESS AND RIPENING (ASR), PROCESSO, MELHORAMENTO GENÉTICO, PLANTA TRANSGÊNICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA E PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA A BAIXOS NÍVEIS DE FOSFATO A presente invenção apresenta a funcionalidade da família gênica Abscisic Acid Stress and Ripening (ASR) nas modificações estruturais de raízes e como gene regulador dos principais genes da via de resposta a baixos níveis de fosfato (PSRs). Especificamente, a presente invenção compreende modificações radiculares como maior produção de raízes laterais e adventícias e alongamento das raízes laterais promovidas pela expressão de genes da família ASR. A invenção atua nos campos da Agronomia e Biologia.



### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

USO DA FAMÍLIA DE GENES E DAS PROTEÍNAS ABSCISIC ACID STRESS AND RIPENING (ASR), PROCESSO, MELHORAMENTO GENÉTICO, PLANTA TRANSGÊNICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA E PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA A BAIXOS NÍVEIS DE FOSFATO

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve sobre o uso de uma família de genes específico como modulador de modificações estruturais de raízes de plantas, principalmente com relação ao crescimento e desenvolvimento de raízes, fenótipo característico de deficiência a fosfato; e regulação de genes chaves nas vias de resposta a falta de fosfato. A presente invenção atua nos campos da Agronomia e Biologia.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** O fósforo é importante nutriente para as plantas e requerido em grande quantidade por elas. Ele encontra-se no solo na forma de fosfato inorgânico (Pi) e organofosfatos e sua principal fonte de extração é a partir das rochas, fonte não renovável, e que pode se esgotar entre 60 e 100 anos.

**[0003]** O fosfato inorgânico, única forma de fósforo disponível às plantas, concentra-se na parte superficial do solo, apresentando pouca mobilidade e baixa disponibilidade absorptiva para as plantas.

**[0004]** De todo o fosfato extraído das rochas, 80% é aplicado na agricultura, sendo que apenas 30% desse nutriente é capaz de ser absorvido pelas plantas, gerando maiores custos e possibilidade de contaminação da água com o fosfato.

**[0005]** Diante de um cenário com pouco fosfato disponível, as plantas apresentam como um dos modos de lidar com a menor disponibilidade do nutriente, modificações que promovam uma maior exploração do solo e aproveitamento do fosfato disponível.

**[0006]** Assim sendo, o conhecimento aqui proposto, do papel da manipulação gênica de plantas para maior captação de fosfato do solo, permite que haja maior captação de fosfato pelas plantas, menor aplicação de fosfato na agricultura e alimentos mais nutritivos.

**[0007]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0008]** O documento patentário BR201106382-A2 revela uma família de genes na modulação das plantas em resposta a tolerância a metais, como o alumínio. O documento se difere da presente invenção por não correlacionar os genes com maior captação de nutrientes.

**[0009]** O documento US2018187207-A1 revela que a superexpressão do gene GRP8 (do inglês, glycine rich protein 8) nas plantas levou a uma maior produção de raízes e pelos radiculares. O documento estuda genes diferentes aos da presente invenção.

**[0010]** O documento CN101508995-A revela que a superexpressão do gene PHR2 em plantas de arroz possibilita maior absorção de fosfato pela planta e seu acúmulo na parte aérea da mesma. Entretanto esse acúmulo em excesso ocorre apenas nas plantas transgênicas enquanto aquelas em condições normais de fosfato apresentam tamanho reduzido. O documento difere da presente invenção quanto ao gene em estudo.

**[0011]** O documento CN108148849-A revela a relação do gene MdPHR1 com a absorção de fosfato em macieiras e *Arabidopsis thaliana*. A presente invenção se difere do documento citado ao trabalhar com outro gene e por compreender maior gama de plantas.

**[0012]** O documento US 9801373-B2 revela uma relação de compostos para promover o crescimento de plantas em condições limitantes de fosfato. A presente invenção, entretanto, permite que a planta se desenvolva em condições de deficiência de fosfato com a aplicação de substâncias estranhas no meio.

**[0013]** Arenhart R.A., Bai Y., de Oliveira L.F., Neto L.B., Schunemann M.,

Maraschin Fdos S., Mariath J., Silverio A., Sachetto-Martins G., Margis R., et al. New insights into aluminum tolerance in rice: The ASR5 protein binds the star1 promoter and other aluminum-responsive genes. *Mol. Plant*. 2014;7:709–721. doi: 10.1093/mp/sst160

**[0014]** Balzergue C, Darteville T, Godon C, Laugier E, Meisrimler C, Teulon JM, Creff A, Bissler M, Bouchoud C, Hagege A et al.: Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat Commun* 2017, 8:15300.

**[0015]** Ham, B. K., Chen, J., Yan, Y., and Lucas, W. J. (2018). Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 1–9. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.005

**[0016]** Identification and expression analysis of OsLPR family revealed the potential roles of OsLPR3 and 5 in maintaining phosphate homeostasis in rice Yue Cao<sup>1</sup> , Hao Ai<sup>1</sup> , Ajay Jain<sup>2</sup> , Xueneng Wu<sup>1</sup> , Liang Zhang<sup>1</sup> , Wenxia Pei<sup>1</sup> , Aiqun Chen<sup>1</sup> , Guohua Xu<sup>1</sup> and Shubin Sun<sup>1,3\*</sup>

**[0017]** Iron and callose homeostatic regulation in rice roots under low phosphorus Yan Ding<sup>1,3</sup> , Zegang Wang<sup>2</sup> , Menglian Ren<sup>2</sup> , Ping Zhang<sup>2</sup> , Zhongnan Li<sup>2</sup> , Sheng Chen<sup>2</sup> , Cailin Ge<sup>2\*</sup> and Yulong Wang<sup>1\*</sup>

**[0018]** Liu TY, Huang TK, Yang SY, Hong YT, Huang SM, Wang FN, Chiang SF, Tsai SY, Lu WC, Chiou TJ: Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nat Commun* 2016, 7:11095

**[0019]** Miki D. & Shimamoto K. (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell and Physiology* 45, 490–495.

**[0020]** Mora-Macias J, Ojeda-Rivera JO, Gutierrez-Alanis D, Yong- Villalobos L, Oropeza-Aburto A, Raya-Gonzalez J, Jimenez- Dominguez G, Chavez-Calvillo G, Rellan-Alvarez R, Herrera- Estrella L: Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114:E3563-E3572.

**[0021]** Péret B, Desnos T, Jost R, Kanno S, Berkowitz O, Nussaume L. Root

architecture responses: in search of phosphate. *Plant Physiol.* 2014;166(4):1713-23.

**[0022]** Ticconi CA, Lucero RD, Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, Desnos T, Abel S: ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:14174-14179.

**[0023]** Wang C, Yue W, Ying Y, Wang S, Secco D, Liu Y, Whelan J, Tyerman SD, Shou H: Rice SPX-Major Facility Superfamily3, a vacuolar phosphate efflux transporter, is involved in maintaining phosphate homeostasis in rice. *Plant Physiol* 2015, 169:2822-2831.

**[0024]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

**[0025]** Dessa forma, a presente invenção se apresenta como uma solução para o problema do estado da técnica de baixa captação fosfato pelas plantas, gerando custos e possibilidade de contaminação da água com o fosfato.

### **Sumário da Invenção**

**[0026]** Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica, a partir do novo uso da família gênica ASR na melhora da captura de nutrientes pela planta, incluindo o fosfato.

**[0027]** As modificações gênicas em plantas com a superexpressão de genes ASR, têm como vantagem a maior captação de fosfato do solo com baixos níveis desse nutriente, de modo a diminuir os custos do produtor; maior sustentabilidade, pois o fosfato é um nutriente insubstituível e não renovável extraído das rochas, cujas reservas podem se esgotar entre 60 e 100 anos e; redução de resíduos, pois como atualmente a absorção desse nutriente é baixa e a aplicação agrícola é alta, a porção não absorvida contamina águas e faz proliferar vegetações aquáticas, prejudiciais para a saúde humana. Diferente da maioria dos genes relatados em outros trabalhos, genes ASR não são

apenas genes de resposta á baixos níveis de fosfato, mas sim genes reguladores dos principais PSRs em plantas.

**[0028]** A presente invenção apresenta os seguintes objetos:

**[0029]** Em um primeiro objeto a presente invenção revela o uso do gene ASR de planta ou sua proteína ASR para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para modulação na captação de nutrientes pela planta;

em que o gene ASR é superexpressado na planta; ou

em que o gene ASR é inserido em uma planta inicialmente ausente de gene, ou

em que a proteína ASR é superexpressada na planta ou adicionada ao meio de crescimento da planta ou semente, ou

em que o gene ASR é silenciado.

**[0030]** Em um segundo objeto a presente invenção revela o processo para a produção de planta transgênica que compreende meios para a modulação na expressão do gene ASR em uma planta para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para modular a captação de nutrientes pela planta.

**[0031]** Em um terceiro objeto a presente invenção revela o vetor de expressão para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes para a modulação na captação de nutrientes pela planta que compreender um promotor heterólogo e o gene ASR.

**[0032]** Em um quarto objeto a presente invenção revela a célula hospedeira transgênica que compreende o vetor de expressão citado anteriormente.

**[0033]** Em um quinto objeto a presente invenção revela a planta transgênica, obtida conforme definido pelo processo aqui descrito.

**[0034]** Em um sexto objeto a presente invenção revela a semente.

**[0035]** Em um sétimo objeto a presente invenção revela a cultura de tecido da célula regenerável, obtida a partir da planta transgênica.

**[0036]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados

pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0037]** A figura 1 apresenta a Arquitetura de raízes de plantas de arroz ASR\_RNAi e NT aos 7 dias de germinação em papel filtro embebido em água.

**[0038]** A figura 2 mostra a sinalização e Sistema de Transporte Envolvido na Homeostase de fosfato (Pi) a Nível Celular em plantas de arabidopsis segundo Ham et al., 2018.

**[0039]** A figura 3 mostra plantas de arroz NT (esquerda) e ASR\_RNAi (direita) aos 20 dias de cultivo em hidroponia em condição de baixos níveis de fosfato.

**[0040]** A figura 4 mostra raízes de plantas de arroz não transformadas (NT) e silenciadas (RNAi\_ASR) aos 20 dias de cultivo em condições de alto (acima) e baixo nível de fosfato (abaixo). Em evidência, as respectivas raízes adventíceas e laterais.

**[0041]** A figura 5 mostra o comprimento das raízes laterais de plantas não transformadas (NT) e plantas silenciadas para os genes ASR (ASR\_RNAi) aos 20 dias de cultivo em hidroponia em condições de altos (esquerda) e baixos níveis de fosfato (direita).

**[0042]** A figura 6 mostra raízes de plantas de arroz NT (esquerda) e RNAi\_ASR (direita) aos 30 dias de cultivo em condição de baixo fosfato.

**[0043]** A figura 7 mostra o padrão de expressão do gene ASR5 em condição de alto nível de fosfato (esquerda) e baixo fosfato (direita).

**[0044]** A figura 8 mostra um esquema, segundo Liang et al. (2014) ilustrando o processo de percepção da falta de fosfato no solo, por parte do ápice radicular e sua conseqüente mudança na arquitetura do sistema radicular, bem como a remobilização de fosfato na planta, corroborando com nossos resultados mostrados na figura 7

**[0045]** A figura 9 mostra plantas de arabidopsis NT em alto e baixo fosfato (esquerda) e plantas expressando heterologicamente OsASR5 (Seq ID 5) alto e baixo fosfato (direita), respectivamente, aos 20 dias de cultivo em meio 0,1x MS, agar 1% e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 µM para baixo fosfato e 1mM para alto fosfato).

**Descrição Detalhada da Invenção**

**[0046]** A presente invenção propõe o uso de genes da família ASR como modulador para a modificação estrutural e bioquímica das plantas para maior captação de nutrientes. O aumento da expressão dos genes ASR levam ao aumento na quantidade de raízes adventícias e laterais, além de maior alongamento das raízes laterais de qualquer planta, e esse aumento provoca uma maior captação de fosfato pela planta.

**[0047]** Apesar de a presente invenção visar o aumento na captação de fosfato pela planta, o aumento na quantidade de raízes adventícias e laterais, e o maior alongamento das raízes laterais, não capta seletivamente apenas o fosfato do meio. A mudança estrutural e bioquímica nas plantas da presente invenção aumenta a captação pelas raízes de qualquer nutriente presente no solo ou no ambiente em que a planta se encontra (hidroponia).

**[0048]** Em um primeiro objeto a presente invenção revela o uso do gene ASR de planta ou sua proteína ASR, para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para modulação na captação de nutrientes pela planta;

em que o gene ASR é superexpressado na planta; ou

em que o gene ASR é inserido em uma planta inicialmente ausente de gene, ou

em que a proteína ASR é superexpressada na planta ou adicionada ao meio de crescimento da planta ou semente, ou

em que o gene ASR é silenciado na planta.

**[0049]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que o gene ASR tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 7 , em que o gene ASR regula pelo menos um dos genes LPR1, Npp1, PHT1, Phospholipase e MSF.

**[0050]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que o gene ASR tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID No 1,



SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 7 , em que o gene ASR regula pelo menos um dos genes LPR1, Npp1, PHT1, Phospholipase,e MSF.

**[0051]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que o gene ASR compreender a SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 7 .

**[0052]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que o gene ASR é a SEQ ID No 7 ou a SEQ ID No 5.

**[0053]** Em uma concretização a presente invenção revela o silenciamento de genes ASR compreendendo o uso de primers SEQ ID No 8 e SEQ ID No 9.

**[0054]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que a planta é uma dicotiledônia ou uma monocotiledônia.

**[0055]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que a planta é de arroz, milho, soja, ou tomate.

**[0056]** Em uma concretização a presente invenção revela o uso do gene ASR em que o nutriente é o fosfato.

**[0057]** Em um segundo objeto a presente invenção apresenta o processo para a produção de planta transgênica em que compreende meios para a modulação na expressão do gene ASR em uma planta para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para modular a captação de nutrientes pela planta.

**[0058]** Em uma concretização do processo, os meios compreenderem:

- a) Transgenia;
- b) Edição gênica pela técnica de CRISPR;
- c) Melhoramento Genético Clássico.

**[0059]** Em uma concretização do processo este compreende meios para o aumento no nível de expressão do gene ASR em uma planta para o aumento no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para o aumento na captação de nutrientes pela planta.

**[0060]** Em uma concretização do processo, este compreende a inserção do

gene ASR no genoma de uma planta, inicialmente ausente desse gene, para a o aumento no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias para o aumento na captação de nutrientes pela planta.

**[0061]** Em uma concretização do processo, o gene é a SEQ ID No 7 ou 5.

**[0062]** Em uma concretização do processo, este compreende:

- a geração de uma planta transgênica;
- cruzamento da planta transgênica com uma planta não transgênica ou com outra planta transgênica para obter a prole híbrida, F1;
- seleção de uma prole híbrida F1 que possui aumento no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias, e
- obtenção de sementes da prole híbrida selecionadas.

**[0063]** Em um terceiro objeto a presente invenção revela o vetor de expressão para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes para a modulação na captação de nutrientes pela planta que compreende um promotor heterólogo e o gene ASR.

**[0064]** Em um quarto objeto a presente invenção revela a célula hospedeira transgênica que compreende o vetor de expressão citado anteriormente.

**[0065]** Em um quinto objeto a presente invenção revela a planta transgênica, obtida conforme definido no processo da presente invenção.

**[0066]** Em um sexto objeto a presente invenção revela a semente e a célula da planta transgênica.

**[0067]** Em um sétimo objeto a presente invenção revela a cultura de tecido da célula regenerável, obtida a partir da planta transgênica.

**[0068]** Inicialmente, utilizou-se como objeto de estudo, plantas de arroz com a família gênica Abscisic Acid Stress and Ripening (ASR) silenciada pela técnica de RNA de interferência (RNAi). A ideia de relacionar essa família de genes à respostas de privação de fosfato surgiu com base no fenótipo de raízes de plantas de arroz, comparando-se plantas transgênicas (ASR\_RNAi) com plantas não transformadas (NT).

**[0069]** Observou-se nos estágios iniciais de desenvolvimento, quando

germinadas em papel filtro embebido em água, uma diferença na arquitetura das raízes entre os diferentes genótipos (Figura 1), sendo que as plantas com a expressão da família ARS silenciada pelo RNAi (RNAi) apresentaram uma drástica redução no tamanho da raiz principal e no número e tamanho de raízes adventícias.

**[0070]** O fósforo é um nutriente pouco móvel e apresenta pouca disponibilidade para as plantas em termos de absorção. Sendo assim, a capacidade das plantas de suprir a necessidade desse nutriente é diretamente correlacionada com a sua habilidade de explorar o solo. Em caso de deficiência de fósforo ocorre uma mudança na arquitetura do sistema radicular, sendo esse um mecanismo adaptativo chave para esse tipo de estresse.

**[0071]** O fósforo concentra-se na parte superior do solo, onde há maior presença de matéria orgânica. Assim, plantas mais adaptadas às condições de baixa concentração de fósforo investem em desenvolvimento de raízes mais superficiais (Péret et. al, 2014).

**[0072]** Em condições de deficiência de fósforo no solo as plantas encontram um dilema: Devem maximizar o uso do fósforo e ao mesmo tempo promover uma maior exploração do solo. Como resultado, essa falta de fósforo leva a uma redução no crescimento radicular enquanto respostas geneticamente programadas induzem o desenvolvimento de novos órgãos. Por esse motivo as plantas passam a produzir mais raízes laterais (Péret et. al, 2014) bem como novas raízes adventícias

### **Sinalização de fósforo**

**[0073]** Em plantas, o vacúolo serve como reservatório primário de fósforo. Recentemente proteínas contendo o domínio SPX-MSF, localizadas no vacúolo têm sido caracterizadas como proteínas mediando o transporte de fósforo através do tonoplasto. Esses transportadores de fósforo contêm um domínio N-terminal SPX e um domínio Major Facilitator Super-Family (MSF) transporter na porção C-terminal. Esses domínios são características da família de proteínas PHT5, as quais funcionam como transportadores de influxo de fósforo no

vacúolo, em arabidopsis.

**[0074]** Em arroz, homólogos de PHT5, OsSPX-MFS1, OsSPX-MFS2 e OsSPX-MFS3 também residem no tonoplasto (Wang et al., 2015). Estudos recentes indicam que esses genes também codificam como transportadores vacuolares de fosfato (Liu et al., 2016).

**[0075]** Em Arabidopsis, PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2) and LOW PHOSPHATE ROOT (LPR1) interagem geneticamente para parar o crescimento da raiz principal em condições limitantes de fosfato (Ticconi et al., 2009). LPR1 atua localmente para regular a atividade do meristema do ápice da raiz primária (RAM), bloqueando a comunicação com o stem cell niche (SCN). Esse processo envolve o fator de transcrição SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY (STOP1), que controla a expressão do ALUMINUM ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1 (ALMT1), um sistema de secreção de malato localizado na membrana plasmática. Posteriormente, o malato liberado no apoplasma media a ativação de um sistema de ciclagem de redução de ferro para induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mora-Macias 2017; Balzergue 2017). Esse acúmulo de ROS induz deposição de calose na SCN da raiz primária, levando ao bloqueio da via de comunicação plasmodesmal, dessa forma, causando a parada da função das células tronco e o crescimento da raiz primária (Fig. 2). Ainda não é sabido como as células da ponta da raiz sentem a presença de baixos níveis de fosfato no solo bem como a transdução de sinal que leva a ativação da expressão de ALMT1 mediada por STOP1 (Ham et al., 2018).

### **Exemplos**

**[0076]** Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

#### **Exemplo 1 - Verificação da influência dos genes ASR nas modificações estruturais das raízes de plantas**

**[0077]** Como objeto de estudo utilizou-se plantas de arroz com a família gênica

Abscissic Acid Stress and Ripening (ASR) silenciada pela técnica de RNA de interferência (RNAi) comparadas com plantas não transformadas (NT).

**[0078]** A planta de arroz foi utilizada apenas como uma planta modelo para estudo, sendo que o uso da família ASR para modulação no tamanho e quantidade de raízes adventícias e laterais pra o aumento da captação de nutrientes pode ser utilizada em qualquer tipo de planta. Podem ser plantas, vasculares em geral, com maior ênfase comercial nas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Outras espécies de plantas além do arroz, que apresentam essa família de genes e que poderiam ser utilizadas para esses experimentos são: milho, soja, tomate etc., plantas importantes para a economia agrícola do país.

**[0079]** As sementes de arroz transformadas (ASR\_RNAi) e as não transformadas (NT) foram cultivadas em papel de filtro embebidas em água por 10 dias. Em seguida, 10 plântulas de cada genótipo e com tamanhos similares foram colocadas em uma solução nutritiva segundo Yoshida (1976), contendo: 2.86mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1.03mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 1.00mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1.67mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_4\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  3  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.15mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.036 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Citric acid (monohydrate), com concentrações de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) diferentes:

**[0080]** 10 plântulas ASR\_RNAi e 10 plântulas NT em 0,016 mM para condição de baixo fosfato e;

**[0081]** 10 plântulas ASR\_RNAi e 10 plântulas NT em 0,323mM para condições de alto fosfato.

**[0082]** Como condição de baixo fosfato, determinaram-se valores de 0,016 mM – 0,02 mM, preferencialmente 0,016 mM.

**[0083]** Em ambas as condições de fosfato o pH foi ajustado para 5,0; sendo a solução nutritiva trocada a cada 3 dias.

**[0084]** Após os 20 dias de cultivo, as plântulas apresentaram diferenças na estrutura radicular. As plantas NT apresentaram maior quantidade de raízes adventícias e laterais, além de maior alongamento das raízes laterais em

condições de baixo fósforo quando comparadas ao mesmo genótipo em condições de alto fósforo. Já as plantas ASR\_RNAi tiveram uma redução de aproximadamente 90% no comprimento de raízes laterais quando comparadas as plantas NT o que sinaliza a importância dos genes ASR nas respostas de modificação estrutural nas raízes para captação de fósforo em condições baixas do mesmo.

#### Exemplo 2 - Principais genes da via de resposta à falta de fósforo (PSR)

**[0085]** Para esta realização, um gene quimérico para produzir RNA com uma estrutura de “hairpin” (hpRNA) foi construída baseada na sequência do locus ASR5 (LOC\_Os11g06720.1). Os primers foram utilizados para amplificar uma região de 417 bp correspondendo a sequência codificadora completa do gene ASR5:

SEQ ID No 8 e SEQ ID No 9.

**[0086]** Os produtos de PCR foram clonados no vetor Gateway pANDA em uma configuração repetida invertida, em que o gene quimérico está sob controle do promotor de ubiquitina de milho com um íntron colocado “upstream” das repetições invertidas. (Miki & Shimamoto 2004).

**[0087]** Sementes de arroz transformadas (ASR\_RNAi) e não transformadas (NT) foram germinadas em papel filtro embebidas em água. Plântulas de 12 dias de idade foram cultivadas em hidroponia (Solução de Baier, pH 5,8, 400 µM CaCl<sub>2</sub>; 650 µM KNO<sub>3</sub>; 250 µM MgCl<sub>2</sub>; 10 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 40 µM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) por duas semanas. Após esse período, amostras de raízes foram coletadas e imediatamente estocadas em nitrogênio líquido. Posteriormente RNA foi extraído pelo método Trizol e realizou-se o sequenciamento do transcriptoma.

**[0088]** Outros métodos de extração de RNA são possíveis, como o CTAB, entretanto, entre os diferentes métodos, a principal diferença é no rendimento de RNA extraído. Sendo assim, não haveria grandes diferenças no resultado do sequenciamento.

**[0089]** A realização do sequenciamento do transcriptoma foi feita da seguinte forma:

**[0090]** O RNA total (>10 µg) foi enviado para “Fasteris Life Sciences SA (Planles-Ouates, Switzerland)” para preparação das amostras (conversão ao cDNA) e sequenciamento utilizando Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA). O sequenciamento do transcrito poliadenilado (mRNA-seq) foi realizado utilizando as seguintes etapas: Purificação da Poly-A, síntese de cDNA utilizando primer poly-T para gerar insertos de 300 a 500 nucleotídeos. Adaptadores de ligações 3p e 5p, pré-amplificação, geração de colônia e sequenciamento. A reação de sequenciamento do cDNA foi realizada utilizando uma fita simples e leituras com o comprimento de 100 nucleotídeos.

**[0091]** As leituras (*reads*) foram alinhadas com o software Bowtie v. 0.12.7 (Langmead et al., 2009) utilizando parâmetros padrão. O primeiro alinhamento foi >28 nucleotídeos de tamanho, permitindo zero incompatibilidade e leituras mapeadas únicas. A sequência do genoma do arroz RGAP v7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) foi usado como referência. Arquivos Bowtie foram então processados utilizando “scripts” Python para atribuir às leituras contadas que mapearam cada região gênica.

**[0092]** A partir de dados de RNAseq comparando-se plantas silenciadas (ASR\_RNAi) e não transformadas (NT) em situação controle, observou-se que genes chave responsáveis à resposta à baixos níveis de fosfato apresentaram sua expressão reprimida nas plantas ASR\_RNAi (Tabela 1).

**Tabela 1**

<b>ID</b>	<b>Nível de alteração da expressão Log2</b>	<b>Descrição</b>
LOC_Os01g03630	- 35,22	Proteína contendo domínio Multicopper Oxidase (LPR1 – Raiz Baixo Fosfato)
LOC_Os11g04020	- 33,33	Principal Superfamília de Facilitadores (MSF)
LOC_Os05g49840	- 33,97	Fosfolipase Putativa
LOC_Os12g38750	- 32,83	Fosfodiesterase Nucleotídeo Pirofosfato (NPP)

LOC_Os01g03620	- 3,94	Proteína contendo domínio Multicopper Oxidase (LPR1 – Raiz Baixo Fosfato)
LOC_Os10g30790	- 3,26	Transportador de Fosfato Inorgânico (PHT)
LOC_Os12g44020	- 2,69	Família de Proteínas Ser Thr Fosfatase
LOC_Os11g05400	- 2,39	Família de Proteínas Ser Thr Fosfatase
LOC_Os03g05640	- 2,30	Transportador de Fosfato Inorgânico (PHT)
LOC_Os05g02310	- 2,23	Pirofosfatase Inorgânica Solúvel
LOC_Os01g01710	- 2,22	Precursor de Cloroplasto Reductoisomerase 1-deoxi-d-xilulose-5-fosfato
LOC_Os04g10750	- 2,17	Transportador de Fosfato Inorgânico (PHT)
LOC_Os05g20100	- 1,98	Aciltransferase Glicerol-3-fosfato
LOC_Os03g05620	- 1,66	Transportador de Fosfato Inorgânico (PHT)

**[0093]** Os dados obtidos mostraram a repressão dos principais genes das via de resposta à falta de fosfato (PSR) nas plantas ASR\_RNAi, o que sinaliza que o gene ASR está regulando os principais genes dessa via e que ele pode ser tanto gene regulador desses PSRs como um próprio gene de resposta aos baixos níveis de fosfato.

#### Exemplo 3 – Potenciais alvos das proteínas ASR

**[0094]** Para verificar os potenciais genes que podem ser regulados diretamente pelas proteínas ASR foram utilizadas duas abordagens: Experimento de ChiP-seq e busca por cis-elementos nas regiões promotoras de genes de resposta à falta de fosfato.

**[0095]** A técnica de ChiP-seq combina imunoprecipitação da cromatina com sequenciamento massivo de DNA para identificar os sítios de ligação de DNA associados com a proteína. Sendo assim, utilizamos essa técnica para verificar os possíveis genes que podem ser regulados pelas proteínas ASR em plantas de arroz. Em relação à via de fosfato, o gene Aluminum-Activated Malate



Transporter, putative, expressed (ALMT1) (LOC\_Os04g34010), está presente nos dados de ChiP-seq.

**[0096]** O software PlantPan foi utilizado para verificar a presença de cis-elementos para ASR5 na região promotora de genes de resposta à falta de fósforo. Entre eles, evidenciamos o gene **LPR1** (em negrito e sublinhado), o qual é responsável por regular a atividade do meristema do ápice da raiz primária em condições de baixo fósforo, em *Arabidopsis*.

**[0097]** > LOC\_Os01g03630 Low Phosphate Root - LPR1

SEQ ID No 10

**[0098]** Logo, os principais genes possivelmente regulados pelos genes ASR e suas respectivas funções são;

- **LPR1**: Reprimido 70 vezes em plantas ASR\_RNAi. Esse gene está relacionado à via de ajuste da atividade meristemática da raiz em condição de baixos níveis de fósforo.

- **Npp1**: Reprimido mais de 60 vezes nas plantas ASR5\_RNAi. Gene responsável pela hidrólise de fósforo, o qual é ativado em condições de baixos níveis de fósforo, assim, fosfatos hidrolizados podem ser importados de fontes extracelulares e utilizados para suprir a falta de fósforo pela planta.

- **PHT1**: Foram encontrados quatro membros dessa família gênica reprimidos nas plantas ASR\_RNAi. Genes PHT são responsáveis pela captura de fósforo do solo e redistribuição na planta.

- **Phospholipase**: Reprimido mais de 60 vezes em plantas ASR\_RNAi. Responsável por aumentar a disponibilidade de fósforo pela hidrólise de fosfolípidos, contribuindo para suprir necessidade de fósforo para metabolismo celular em condições de baixos níveis do nutriente.

- **MSF**: Reprimido mais de 60 vezes em plantas ASR\_RNAi. Esse gene atua como transportador de efluxo de fósforo no tonoplasto.

#### Exemplo 4 – Análise fenotípica em plantas de arroz

**[0099]** Sementes de arroz ASR\_RNAi e NT foram germinadas em papel filtro

embebidas em água por 10 dias. Em seguida, 10 plântulas de cada genótipo de tamanhos similares foram colocadas em solução nutritiva segundo Yoshida (1976), contendo: 2.86mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1.03mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 1.00mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1.67mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.15mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.036 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Citric acid (monohydrate), sendo duas diferentes concentrações de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Para a condição de baixo nível de fosfato utilizou-se 0,016 mM e para alto fosfato 0,323mM. Em ambas condições o pH foi ajustado para 5,0. A temperatura foi ajustada para  $28^\circ\text{C} \pm 2$  e a luminosidade presente por 12 horas.

**[0100]** As avaliações fenotípicas das plantas foram realizadas aos 20 e 30 dias após serem submetidas à hidroponia. A cada 3 dias realizou-se a troca da solução nutritiva (figura 3).

#### Genes ASR são essenciais para o desenvolvimento de raízes em resposta à baixo fosfato

**[0101]** A partir de 20 dias de cultivo em hidroponia, observou-se diferença na arquitetura do sistema radicular. Em condição de baixo fosfato plantas NT produziram mais raízes adventícias e principalmente, maiores quantidade e maior comprimento de raízes laterais, quando comparadas com o mesmo genótipo em condição normal de fosfato. No caso das plantas ASR\_RNAi, em baixos níveis de fosfato não houve aumento no desenvolvimento de raízes adventícias e laterais, ou seja, o sistema radicular apresentou a mesma arquitetura em ambas as concentrações de fosfato. Esse resultado indica que na ausência dos genes ASR as raízes foram incapazes de responder a deficiência de fosfato através da alteração da arquitetura do sistema radicular (figuras 4 a 6).

#### Exemplo 5 - Padrão de Expressão do Promotor do gene ASR5 fusionado ao gene repórter GUS em resposta a baixo e alto nível de fosfato

**[0102]** Avaliou-se o padrão de expressão do gene ASR5 através do sistema repórter GUS (pASR5:GUS). Para esse experimento, plantas transgênicas expressando GUS sob controle do promotor do gene ASR5 foram utilizadas.

**[0103]** Plântulas de 10 dias foram submetidas à solução de alto e baixo nível de fosfato 0,323mM e 0,016mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Estudos prévios demonstram que a expressão do gene ASR5 localiza-se no ápice radicular, como confirmado em nosso estudo (Fig.7). No entanto, em baixo nível de fosfato, o padrão de expressão foi alterado: ocorreu um acúmulo na expressão de GUS nas raízes laterais. Como já mencionado, sabe-se que a deficiência de fosfato no meio de cultivo é sentida pelo ápice radicular, em seguida ocorrem sucessivas transduções de sinal resultando em uma mudança na arquitetura da raiz, incluindo um maior desenvolvimento de raízes laterais (fig. 8).

**[0104]** Desse modo, é possível inferir que o gene ASR5 pode estar relacionado com a sinalização de fosfato, pois é expresso normalmente na ponta da raiz, onde se dá a sensibilidade à falta de fosfato e posteriormente passa a ser expresso nas raízes laterais, as quais aumentam seu desenvolvimento e crescimento de modo a incrementar a absorção de fosfato.

#### Exemplo 6 - Análise Fenotípica de plantas expressando heterologicamente ASR5 em Plantas de *Arabidopsis*

**[0105]** Neste experimento foram utilizadas plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando ASR5 (ASR5\_OE) de plantas de arroz. E como controle negativo utilizou-se plantas columbia (NT).

**[0106]** As plantas de *A. thaliana* expressando o gene ASR5 de arroz (LOC\_Os11g06720) foram obtidas previamente a este trabalho. Plantas selvagens do ecotipo Col-0 de *A. thaliana* foram crescidas em sala de cultivo na temperatura de 23 °C e fotoperíodo de 16h de luz/8h escuro até que entrassem no estágio de florescimento. A transformação foi feita pelo método Floral Dip (Clough & Bent, 1998), utilizando a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* da estirpe EHA105 carregando o plasmídeo pEarleyGate101 (Earley et al., 2006) contendo a sequência codificadora do gene OsASR5 clonada de forma a permitir a expressão de um produto de fusão de ASR5 à proteína fluorescente amarela (YFP), sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Para este trabalho, foram utilizadas plantas na

geração T4 após análise da expressão da proteína recombinante por meio de microscopia de fluorescência.

**[0107]** As sementes de *Arabidopsis* foram germinadas em placas de petri utilizando-se meio murashige e skoog (MS) 0,1x e agar 1% suplementados com 1µM ou 1mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (baixo e alto fosfato, respectivamente).

**[0108]** O fenótipo das raízes foi avaliado aos 20 dias de cultivo.

Nas plantas controle (NT), observou-se o fenótipo característico de deficiência de fosfato, ou seja, diminuição do crescimento da raiz primária e maior desenvolvimento das raízes laterais. No caso das plantas ASR5\_OE, esse fenótipo foi mais intenso, com raízes ainda mais curtas e mais ramificadas, comparadas às raízes da planta NT. Nesse contexto, pode-se inferir que o gene ASR5 desempenha um papel na sensibilidade à falta de fosfato em raízes. A superexpressão de ASR5 (Seq ID 5) é capaz de induzir uma maior produção e ramificação de raízes em condições de alto fosfato, possivelmente aumentando a captação de minerais do solo. Estas características sugerem que a superexpressão de ASR5 tem o potencial de maximizar a captação de nutrientes do solo tornando as plantas menos suscetíveis à deficiência nutricional e possibilitando uma menor utilização de adubação química (figura 9).

#### Exemplo 7 - Análise Fenotípica de plantas superexpressando ASR

**[0109]** Estudos estão sendo feitos para se produzir plantas de soja que estejam superexpressando ASR3 (Seq ID 7 (em andamento)). Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

### **Reivindicações**

1. Uso do gene ASR de planta ou sua proteína ASR, **caracterizado** por ser para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para modulação na captação de nutrientes pela planta;

em que o gene ASR é superexpressado na planta; ou

em que o gene ASR é inserido em uma planta inicialmente ausente de gene, ou

em que a proteína ASR é superexpressada na planta ou adicionada ao meio de crescimento da planta ou semente, ou

em que o gene ASR é silenciado na planta.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo gene ASR ter pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 7, em que o gene ASR regule pelo menos um dos genes LPR1, Npp1, PHT1, Phospholipase e MSF.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo gene ASR ter pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 7, em que o gene ASR regule pelo menos um dos genes LPR1, Npp1, PHT1, Phospholipase, e MSF.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo gene ASR compreender a SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 7.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4 **caracterizado** pelo gene ASR ser a SEQ ID No 7 ou a SEQ ID No 5.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo silenciamento de genes ASR compreender o uso da SEQ ID No 8 e da SEQ ID No 9.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores **caracterizado** pela planta ser uma dicotiledônia ou uma monocotiledônia.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores **caracterizado** pela planta ser de arroz, milho, soja, ou tomate.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores **caracterizado** pelo nutriente ser o fosfato.

10. Processo para a produção de planta transgênica, **caracterizado** por compreender meios para a modulação na expressão do gene ASR em uma planta para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para modular a captação de nutrientes pela planta.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10 **caracterizado** pelos meios compreenderem:

- a) Transgenia;
- b) Edição gênica pela técnica de CRISPR;
- c) Melhoramento Genético Clássico.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 10 ou 11 **caracterizado** por compreender meios para o aumento no nível de expressão do gene ASR em uma planta para o aumento no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias de uma planta para o aumento na captação de nutrientes pela planta.

13. Processo, **caracterizado** por compreender a inserção do gene ASR no genoma de uma planta, inicialmente ausente desse gene, para o aumento no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias para o aumento na captação de nutrientes pela planta.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13 **caracterizada** pelo gene ser o SEQ ID No 7 ou 5.

15. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, **caracterizado** por compreender:

- a geração de uma planta transgênica;
- cruzamento da planta transgênica com uma planta não transgênica ou

com outra planta transgênica para obter a prole híbrida, F1;

- seleção de uma prole híbrida F1 que possui aumento no tamanho e na quantidade de raízes laterais e adventícias, e

- obtenção de sementes da prole híbrida selecionadas.

16. Vetor de expressão para a modulação no tamanho e na quantidade de raízes para a modulação na captação de nutrientes pela planta **caracterizado** por compreender um promotor heterólogo e o gene ASR.

17. Célula hospedeira transgênica **caracterizada** por compreender o vetor de expressão da reivindicação 16.

18. Planta transgênica, **caracterizada** por ser obtida conforme definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 15.

FIGURAS

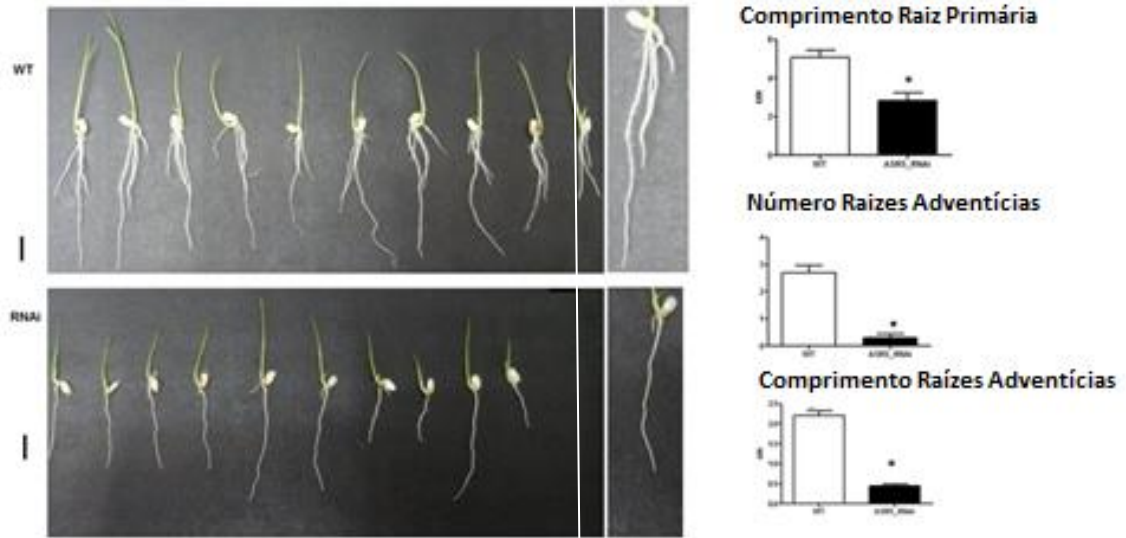


Figura 1

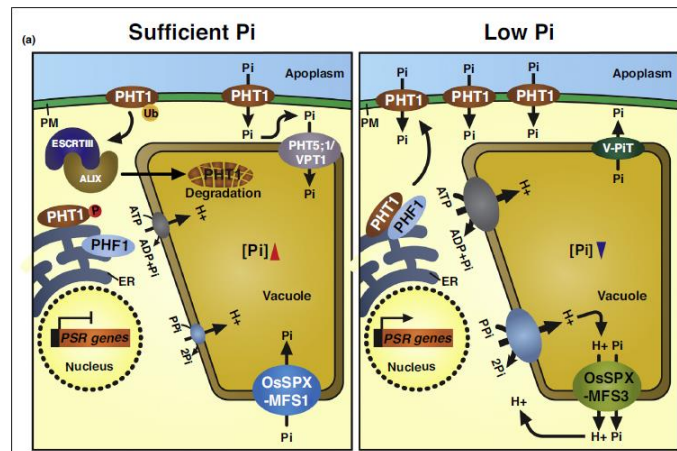


Figura 2





Figura 3



Figura 4

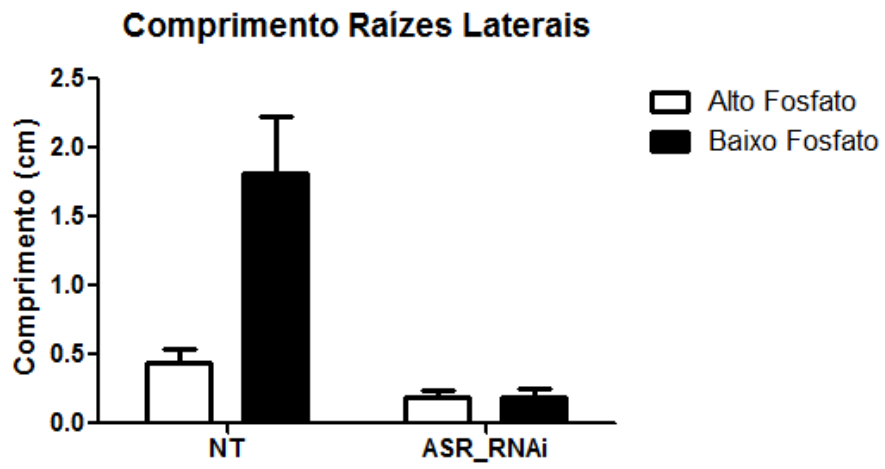


Figura 5



Figura 6

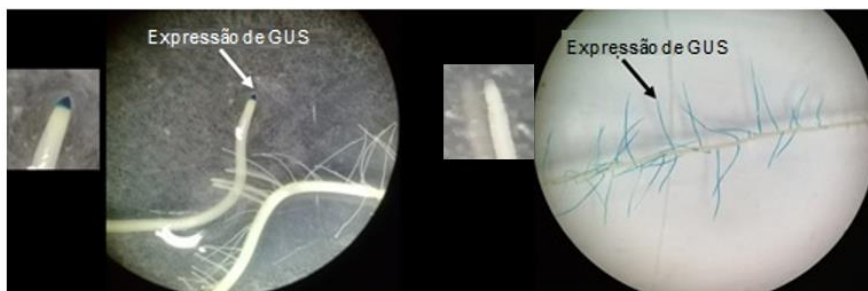


Figura 7

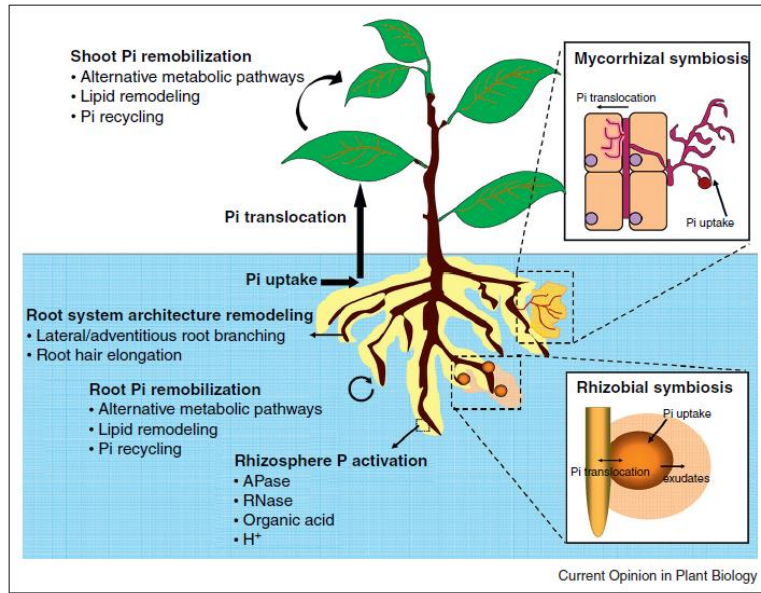


Figura 8

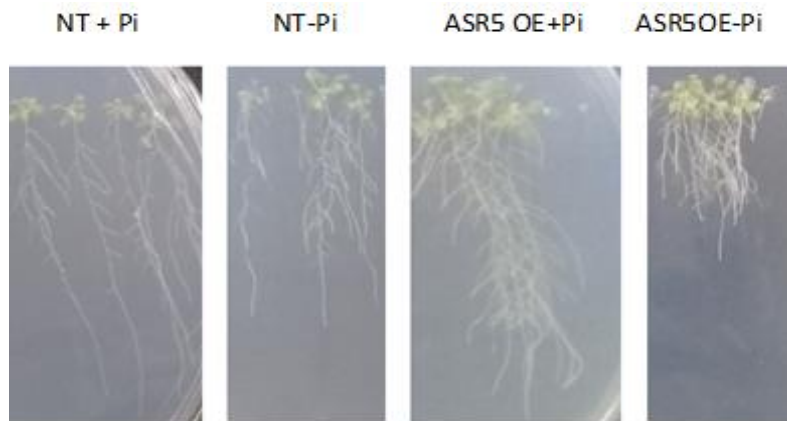


Figura 9

**Resumo**

USO DA FAMÍLIA DE GENES E DAS PROTEÍNAS ABSCISIC ACID STRESS AND RIPENING (ASR), PROCESSO, MELHORAMENTO GENÉTICO, PLANTA TRANSGÊNICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA E PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA A BAIXOS NÍVEIS DE FOSFATO

A presente invenção apresenta a funcionalidade da família gênica Abscisic Acid Stress and Ripening (ASR) nas modificações estruturais de raízes e como gene regulador dos principais genes da via de resposta a baixos níveis de fosfato (PSRs). Especificamente, a presente invenção compreende modificações radiculares como maior produção de raízes laterais e adventícias e alongamento das raízes laterais promovidas pela expressão de genes da família ASR. A invenção atua nos campos da Agronomia e Biologia.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: UFRGS - ASR - Emenda listagem de sequencias -
- Data de Geração do Código: 19/12/2019
- Hora de Geração do Código: 16:52:55
- Código de Controle:
  - Campo 1: D01B2E4368E1C0B9
  - Campo 2: 70223EFCCDCB4427