

VERSÃO CORRIGIDA

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
18 de Maio de 2012 (18.05.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2012/061911 A9

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C12N 15/29 (2006.01) A01H 5/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

[BR/BR]; Parque Estação Biológica W5-Norte, Asa Norte,
CEP: 70770-900 - Brasília - DF (BR).

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2011/000412

(74) Mandatário : AGÊNCIA UFRJ DE INOVAÇÃO; Av.
Pedro Calmon, 550/810B Prédio Reitoria CEP21941-901,
Cidade Universitária - Ilha do Fundão - RJ - Brasil, Att.:
Ricardo Pereira e/ou Rogério Filgueiras (BR).

(22) Data do Depósito Internacional :
8 de Novembro de 2011 (08.11.2011)

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
PI 1015903-7
12 de Novembro de 2010 (12.11.2010) BR

(71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto
US) : UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO [BR/BR]; Av. Pedro Calmon, 550, Prédio
Reitoria, 2o andar, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ,
CEP 21941 -901 (BR). EMPRESA BRASILEIRA DE
PESQUISA AGROPECUARIA EMBRAPA
(CENARGEN) [BR/BR]; Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5
Norte, (final), Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, CEP:
70770-91 CNPJ: 00.348.003/0038-02 (BR).

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) : ALVES
FERREIRA, Marcio [BR/BR]; Rua Visconde de Silva,
49/103, Botafogo, Rio de Janeiro, CEP 22271 091 - Rio de
Janeiro, RJ (BR). PINHEIRO DA CRUZ
WALTENBERG, Fernanda [BR/BR]; Praia de Botafogo
80/401 - Botafogo, CEP: 22250-145 - Rio de Janeiro, RJ
(BR). ROMANO DE CAMPOS PINTO, Eduardo
[BR/BR]; Parque Estação Biológica W5-Norte Final,
Prédio de, Biotecnologia- sala 6 - Asa Norte, CEP: 70770-
900 - Brasília - DF (BR). GROSSI DE SÁ, Maria Fátima

Declarações sob a Regra 4.17 :

— relativa à autoria da invenção (Regra 4.17(iv))

Publicado:

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

— com listagem de seqüências, parte da descrição (Regra
5.2(a))

(Continua na página seguinte)

(54) Title : USE OF THE COFFEE HOMEBOX GENE CAHB12 TO PRODUCE TRANSGENIC PLANTS WITH GREATER
TOLERANCE TO WATER SCARCITY AND SALT STRESS

(54) Título : UTILIZAÇÃO DO GENE HOMEBOX DE CAFÉ CAHB12 NA PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS
MAIS TOLERANTES AO DÉFICIT HÍDRICO E ESTRESSE SALINO

(57) Abstract : The proposed innovation relates to the biotechnological improvement of plant species of commercial interest. More specifically, the present invention relates to the production of transgenic plants with greater tolerance to water scarcity and salt stress by means of the expression of a new gene of coffee (of the *Coffea arabica* species), belonging to the HD-Zip family, and characterised by a homeodomain associated with a leucine zipper. The expression of this transcriptional factor is induced in leaves and roots of coffee plants subjected to various water scarcity conditions (both moderate and severe); transgenic plants that over-express this gene exhibit greater tolerance both to different drought intensities and to high salt concentrations.

(57) Resumo : A inovação ora proposta está relacionada ao melhoramento biotecnológico vegetal de espécies de interesse comercial. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada com a produção de plantas transgênicas mais tolerantes ao déficit hídrico e estresse salino, através da expressão de um novo gene de café (sp. *Coffea arábica*), pertencente à família HD-Zip, caracterizada pela presença do homeodomínio associado a um zipper de leucina. A expressão desse fator transcricional é induzida em folhas e raízes de plantas de café submetidas a diferentes condições de déficit hídrico (moderado e severo), e plantas transgênicas sobre-expressando esse gene apresentam uma maior tolerância, tanto a diferentes níveis de seca, quanto a elevadas concentrações de sal.

WO 2012/061911 A9



(88) Data de publicação do relatório de pesquisa internacional :

1 de Novembro de 2012

(15) Informação sobre Correção :
MISSING

(48) Data de publicação da presente versão corrigida :

3 de Outubro de 2013

UTILIZAÇÃO DO GENE HOMEBOX DE CAFÉ *CAHB12* NA PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS MAIS TOLERANTES AO DÉFICIT HÍDRICO E ESTRESSE SALINO

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção está relacionada ao melhoramento biotecnológico vegetal de espécies de interesse comercial. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada com a produção de plantas transgênicas mais tolerantes ao déficit hídrico e estresse salino, através da expressão de um novo gene de café (sp. *Coffea arabica*), pertencente à
10 família HD-Zip, caracterizada pela presença do homeodomínio associado a um zíper de leucina. A expressão desse fator transcricional é induzida em folhas e raízes de plantas de café submetidas a diferentes condições de déficit hídrico (moderado e severo) e, as plantas transgênicas sobre-expressando esse gene apresentam uma maior tolerância, tanto a diferentes níveis de seca, quanto a
15 elevadas concentrações de sal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os estresses abióticos, causados por temperaturas muito baixas ou elevadas, pela falta de água, ou por altas concentrações de sais ou metais pesados nos solos, são responsáveis por grandes perdas na agricultura,
20 reduzindo de forma drástica a produção e gerando perdas que podem chegar a mais de 50% (Boyer, 1982; Wang *et al.*, 2003). Para sobreviver em ambientes tão hostis, os vegetais desenvolveram uma série de complexas estratégias que envolvem alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares, na tentativa de se tornarem mais tolerantes (Nakashima *et al.*, 2009; Verslues *et al.*, 2006).
25 Dentre os estresses abióticos, a seca tem recebido crescente atenção, pois, além de limitar a produtividade, possui um importante papel na determinação da distribuição das espécies em diferentes ecossistemas. A preocupação com

o impacto potencial que as mudanças climáticas podem causar na temperatura e nos padrões pluviométricos esbarra na crescente necessidade do aumento de produtividade agrícola (Ramalho *et al.*, 2009). Em todo o mundo, cerca de 70% de água disponível para consumo é utilizada na agricultura e, apesar de a irrigação ser uma estratégia utilizada para amenizar os danos causados pela escassez hídrica, o sistema irrigado também apresenta desvantagens, como o aumento do custo da produção e a salinização dos solos (Somerville & Briscoe, 2001). O melhoramento clássico de espécies importantes agronomicamente (e.g. *Coffea arabica*) visando ao desenvolvimento de características como, floração, maior produtividade, e maior resistência a pragas e a estresses abióticos (e.g. geadas e secas), apesar de bem sucedido, é também considerado um processo lento e que requer uma imensa demanda de trabalho e recursos financeiros (Etienne *et al.*, 2002).

Estudos com fatores de transcrição pertencentes à família homeobox, mais especificamente à família HD-Zip, revelaram que esses fatores podem estar envolvidos na modulação de respostas das plantas à seca, controlando o desenvolvimento vegetal em tais condições (Deng *et al.*, 2006; Dezar *et al.*, 2005). A família de proteínas HD-Zip é caracterizada pela presença do homeodomínio (HD) associada a um zíper de leucina (LZ) adjacente, importante para a formação de homo- e heterodímeros (Frank *et al.*, 1998; Johannesson *et al.*, 2001; Ruberti *et al.*, 1991; Sessa *et al.*, 1993). A associação desses dois elementos (HD e LZ) em uma única proteína é exclusiva de plantas, e essa família representa, em número de membros, de 40 a 50% de todos os genes homeobox presentes desde musgos até angiospermas. Até o momento, quatro subfamílias de proteínas HD-Zip (HD-ZipI, II, III e IV) podem ser distinguidas com base na similaridade de seqüência e estrutura gênica dentro e fora do HD (Mukherjee *et al.*, 2009). A expressão de

genes pertencentes especialmente à subfamília HD-Zip1 é, em geral, modulada por fatores ambientais (e.g. luz, baixas temperaturas, estresse salino e hídrico), e o seu papel na regulação do desenvolvimento vegetal em respostas a esses estímulos pode levar ocasionalmente a fenótipos de maior tolerância à seca
5 (Ariel *et al.*, 2007).

A patente, US nº 5981729, refere-se a um novo gene da família homeobox, isolado da espécie *Arabidopsis thaliana* que codifica o fator de transcrição *ATHB-12*, relacionado com a resposta à seca a ao ácido abscísico (ABA). O dito gene pode ser clonado em vetores de expressão para produzir
10 um sistema de expressão recombinante de DNA, adequado para a transformação de células vegetais e produção de plantas transgênicas mais tolerantes à seca. A referida patente, no entanto, não menciona, nem faz referência a nenhum experimento de tolerância com plantas transgênicas portando o referido gene.

15 A patente WO 04/099365 descreve uma invenção caracterizada por um gene isolado de *Helianthus annuus* que codifica o fator de transcrição *HAHB-4*, pertencente à família HD-Zip. O gene *HAHB4* possui sua expressão induzida pelo déficit hídrico ou pelo ácido abscísico (ABA), e pode ser clonado em construções de DNA para transformar células hospedeiras e plantas. As
20 plantas transgênicas que expressam o gene do fator de transcrição são tolerantes e resistentes ao déficit hídrico e salinidade elevada. Na presente invenção, o novo gene de café *CAHB12* codifica também um fator transcricional da família HD-Zip, expresso em folhas e raízes de plantas de café da espécie *Coffea arabica* cultivadas em condições de déficit hídrico,
25 apresentando níveis crescentes de expressão, de acordo com a severidade do estresse experimentado. Plantas transgênicas portando esse gene sob o controle do promotor 35S, que garante uma expressão constitutiva, i.e, em

todos os órgãos em altos níveis, apresentam uma maior tolerância a diferentes condições de déficit hídrico, em diferentes estádios do desenvolvimento, assim como uma maior tolerância ao estresse salino. Os níveis de tolerância ao estresse salino de plantas portando o gene *CAHB12* são ainda maiores do que

5 aqueles observados em plantas portando o gene *HAHB4*, descrito na patente WO 04/099365. No presente estudo, além da taxa de germinação na presença de concentrações variadas de NaCl (100 e 150mM), foram também avaliadas medidas de peso fresco, assim como foram também monitorados os níveis de peroxidação lipídica mediado pelo déficit hídrico, através das taxas de aldeído

10 malônico. Plantas transgênicas, expressando o gene *CAHB12* apresentaram taxas de germinação de 20 a 45% superiores às de plantas não transgênicas cultivadas na presença de 150mM de NaCl. Na patente WO 04/099365, a porcentagem de plantas transgênicas e não transgênicas germinadas 46 horas após o início do experimento foi a mesma (100%). Na presente invenção, as

15 plantas pertencentes às linhagens transgênicas expressando o gene *CAHB12* apresentaram medidas de peso fresco mais elevadas do que aquelas observadas para plantas selvagens germinadas em meio de cultivo contendo 100mM de NaCl. Além disso, o nível de peroxidação lipídica permaneceu praticamente inalterada em duas, das três linhagens transgênicas testadas

20 quando cultivadas na presença de 100mM de NaCl. Nesse contexto, a presente invenção pode ser utilizada para conferir uma maior tolerância à seca e estresse salino em plantas, obtendo-se ainda uma melhor performance em relação ao estresse salino, do que aquela observada e descrita na patente WO 04/099365.

25

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é a utilização do gene *CAHB12* de café, ou um fragmento dele originado, para a produção de plantas

transgênicas de café ou espécies relacionadas, que sejam mais tolerantes ao déficit hídrico e ao estresse salino. A construção em vetor binário pB2GW7 contém a seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína CAHB12 fusionada ao promotor 35S, e pode ser utilizada diretamente para a
5 transformação de plantas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O gene *CAHB12* foi isolado em café, através de buscas por genes homeobox que apresentassem sua expressão modulada em condições de déficit hídrico, utilizando-se dados disponibilizados pelo projeto Genoma
10 Café. O gene *CAHB12* foi classificado como pertencente à família HD-Zip1, através de análises filogenéticas utilizando-se do método de máxima verossimilhança. A seqüência correspondente ao cDNA completo do gene *CAHB12* foi amplificado através de reações de PCR, e possui 693 pares de base, dando origem a uma proteína formada por 230 aminoácidos. Os
15 domínios HD (homeodomínio) e Lz (zíper de leucina) encontram-se localizados na região próxima à porção N-terminal da proteína (Figura 1). A localização nuclear da proteína *CAHB12* foi confirmada através de ensaios de expressão transiente, através do bombardeamento de folhas de café com partículas de ouro revestidas com uma construção plasmidial contendo a região codificadora
20 completa para a proteína *CAHB12* e GFP (*green fluorescent protein*), fusionadas traducionalmente, e sob o controle do promotor 35S (Figura 2).

O padrão de expressão do gene *CAHB12* em folhas e raízes de café foi analisado através de reações de PCR em tempo real (RT-qPCR) em plantas de café da espécie *Coffea arabica*, cultivares 'Catuaí Vermelho IAC44'
25 e 'Bourbom Amarelo IAC J10'. Em condições normais de cultivo em casa de vegetação (21 ± 2 °C e fotoperíodo natural) o gene *CAHB12* apresentou baixos níveis de expressão, sendo induzido gradativamente em condições de déficit

hídrico, em plantas apresentando medidas de potencial hídrico característico de estresse (Figuras 3 e 4). Os experimentos de estresse hídrico em casa de vegetação foram realizados utilizando-se de plantas de café com seis meses de idade, em bandejas contendo 20 plantas cada. A rega das plantas utilizadas
5 como controle foi realizada utilizando-se 500mL de água por bandeja, em intervalos de um dia. O potencial hídrico (ψ_w) de cada planta foi medido no período antes do amanhecer com o auxílio de uma câmara de pressão tipo Scholander. O estresse hídrico foi induzido através da interrupção da rega, por 10 dias. Amostras compostas por folhas totalmente expandidas (terceiro par) e
10 raízes laterais foram coletadas em períodos distintos de indução (2, 5 e 10 dias). Os experimentos foram realizados em duplicata, e cada amostra foi composta por material proveniente de 5 plantas de café submetidas às mesmas condições. Em ambos os experimentos, o perfil de expressão do *CAHB12* em condições de déficit hídrico apresentou a mesma tendência de
15 indução. Amostras de plantas cultivadas em condições controle foram coletadas nos mesmos períodos de indução de estresse para comparação.

Após 5 dias de indução, plantas do cv. 'Catuaí Vermelho' (total de 5 plantas) apresentaram uma média de ψ_w igual a -1,05 MPa ($\pm 0,92$ DP), enquanto plantas pertencentes ao cv. 'Bourbom Amarelo' apresentaram uma
20 média de -3,4 MPa ($\pm 2,15$ DP). O mesmo pode ser observado para o período de indução de 10 dias, em que as plantas apresentaram médias de ψ_w iguais a -4,45 MPa ($\pm 1,30$ DP) e <-6,5 MPa, para os cvs. 'Catuaí Vermelho' e 'Bourbom Amarelo', respectivamente, caracterizando um déficit hídrico severo (Figura 3).
No entanto, para o período de 2 dias de indução, ambos os cultivares
25 apresentaram médias de ψ_w similares ao das plantas controle, que permaneceu aproximadamente igual a -0,23 MPa ($\pm 0,10$ DP) para plantas do cv. 'Catuaí Vermelho', e -0,23 MPa ($\pm 0,15$) para plantas do cv. 'Bourbom Amarelo'.

Embora os resultados obtidos para ambos os cultivares não possam ser diretamente comparados, nos dois casos as plantas apresentaram valores de ψ_w característicos de estresse somente 5 dias após o início dos experimentos, coincidindo com a indução de expressão de *CAHB12*, o que demonstra a especificidade de indução desse gene em condições de seca.

A obtenção de plantas sobre-expressando o gene *CAHB12* foi realizada através da clonagem do cDNA completo do gene sob o controle do promotor 35S no vetor *Gateway*[®] pB2GW7 (Karimi *et al.*, 2002) (Figura 5). Plantas transgênicas da espécie *Arabidopsis thaliana* foram transformadas através do sistema de infiltração da inflorescência mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (*floral-dip*) (Desfeux *et al.*, 2000). Três linhagens independentes (A, B e D) de plantas transgênicas contendo o gene *CAHB12* de café, segregando 3:1, foram selecionadas em meio de cultura contendo o herbicida glifosinato sal de amônio (basta). A seleção das plantas transgênicas até a terceira geração foi realizada somente através dos ensaios de segregação. Sementes e plantas pertencentes às linhagens T3, produzidas pelas plantas T2 homozigotas, foram então utilizadas para os testes de tolerância ao estresse hídrico e salino. Estudos de expressão através de RT-PCR foram realizados com plantas homozigotas da geração T3 pertencentes às linhagens A, B e D (Figura 6A). De maneira geral, as plantas transgênicas não apresentaram nenhuma alteração fenotípica aparente. Para os ensaios realizados em placas, utilizando meio de cultura tratado com PEG 8000, as taxas de aldeído malônico (MDA) foram monitoradas com o objetivo de medir o nível de estresse sofrido pelas plantas. O MDA é um indicador do processo de peroxidação lipídica mediado por radicais livres conseqüentes do estresse hídrico (Hodges *et al.*, 1999).

Plântulas pertencentes às três linhagens transgênicas sobre-expressando o gene *CAHB12* produziram menos MDA do que as plantas selvagens de *A. thaliana* quando submetidas às mesmas condições de estresse em placa (-1,2 MPa) (Figura 6B). Em todos o experimentos, a
5 linhagem transgênica D foi aquela que apresentou os menores níveis de produção de MDA, cerca de 37 $\mu\text{mol/Kg}$, seguida pelas linhagens B e A, que apresentaram valores aproximados de 40 e 41 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente. As medidas observadas para a linhagem B, no entanto, foram aquelas que apresentaram uma maior flutuação, variando entre 34 e 45 $\mu\text{mol/Kg}$.

10 Dois tipos distintos de ensaios de sobrevivência ao estresse hídrico foram realizados com plantas em solo. No primeiro experimento, plantas selvagens e transgênicas foram submetidas a um déficit hídrico severo. A taxa de sobrevivência das plantas transgênicas e selvagens foi calculada dois dias após a reidratação das bandejas. As plantas transgênicas apresentaram
15 sempre a mesma tendência durante os ensaios, apresentando uma taxa média de sobrevivência, em torno de 29% a mais do que aquela observada para as plantas selvagens (Figura 7). No segundo tipo de ensaio de sobrevivência, foi aplicado um estresse hídrico contínuo, em que as plantas foram submetidas a uma desidratação mais lenta e gradual. Para os testes de estresse contínuo,
20 foram utilizadas plantas no momento de transição da fase reprodutiva para a fase de frutificação. Novamente, as plantas transgênicas apresentaram uma taxa média de sobrevivência, após a reidratação, aproximadamente 87% mais elevadas do que aquela observada para plantas selvagens (Figura 8).

Ensaios de tolerância ao estresse salino foram realizados em
25 placas contendo meio de cultura suplementado com 100 e 150 mM de NaCl (Liu *et al.*, 2009). As plantas transgênicas sobre-expressando o gene *CAHB12* apresentaram taxas de germinação mais elevadas do que as plantas selvagens

em placas contendo 100 mM e 150 mM de NaCl (Figura 9). A diferença entre as taxas de germinação de plantas selvagens e transgênicas se mostrou mais evidente nos experimentos realizados em placas contendo 150 mM de NaCl, do que nos experimentos realizados com 100 mM NaCl. Nos dois casos, porém, a linhagem D foi aquela que apresentou os menores níveis de inibição da germinação pelo estresse salino (Figura 9A).

As plantas pertencentes às três linhagens transgênicas germinadas em meio contendo 100 mM de NaCl apresentaram medidas de peso fresco mais elevadas do que aquelas observadas para plantas selvagens (Figura 9B e 10A). Estas medidas foram realizadas 15 dias após a transferência das placas para a câmara de crescimento. O peso fresco das plantas transgênicas sob condições de estresse foi ainda maior do que aquele observado para plantas da mesma linhagem, cultivadas em condições-controle. Essa diferença foi ainda mais contrastante para plantas pertencentes às linhagens B e D, que apresentaram valores em torno de 45 e 50mg para cada 10 plântulas cultivadas em meio de cultura suplementado com 100 mM de NaCl, respectivamente, contra 27mg para cada 10 plântulas cultivadas em condições controle.

As medidas de MDA para os experimentos realizados em placas contendo 100 mM de NaCl demonstram uma maior tolerância das plantas transgênicas ao estresse salino, uma vez que estas apresentaram níveis de peroxidação lipídica menores do que aqueles observados em plantas selvagens (Figura 10B). Dois experimentos independentes de estresse salino em placas contendo 100 mM de NaCl foram realizados.

De forma resumida, o gene *CAHB12* é induzido especificamente em condições de déficit hídrico em folha e raízes de café indicando a sua importância na resposta a esse estresse. Sob o controle do promotor 35S, o

gene *CAHB12* é capaz de conferir maior tolerância ao déficit hídrico e estresse salino de plantas da espécie *A. thaliana*, em diferentes fases do seu desenvolvimento. A referida invenção pode ser utilizada para a produção de plantas transgênicas pertencentes a diferentes espécies de interesse comercial. Cabe ainda ressaltar que a utilização de genes da própria espécie na produção de plantas transgênicas constitui uma vantagem do ponto de vista biotecnológico.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 – ISOLAMENTO E CLONAGEM DO cDNA COMPLETO DO GENE *CAHB12* EM VETORES BACTERIANOS E DE EXPRESSÃO EM PLANTAS.

A seqüência completa do cDNA do gene homeobox *CAHB12* foi clonada através da amplificação por PCR do cDNA sintetizado a partir do RNA de plantas de café submetidas a sete dias sem rega. Os pares de iniciadores GW11116/11116mon, descritos na Tabela 1, foram utilizados para a amplificação do gene *CAHB12*. As reações de PCR foram realizadas em um total de 50µL, contendo 1µL de cDNA diluído 1:2, MgSO₄ 1mM, 0,4mM de cada dNTP, 0,1µM de cada iniciador, 10µL do tampão de PCR *Pfx* 10X concentrado, e 1U da enzima *Platinum[®]Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen). Cada reação foi incubada por 2 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de amplificação de 15 segundos, a 94°C, 30 segundos a 55°C, e 2 minutos a 68 °C. Finalmente, uma etapa final de extensão a 68°C, por 10 minutos, foi realizada. A banda obtida apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 693pb para o gene *CAHB12*.

As reações de PCR foram purificadas utilizando-se do kit *DNA Clean & ConcentratorTM* (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi então primeiramente clonado no vetor de entrada pENTRTMD-TOPO (Invitrogen), para posterior recombinação em vetores de

expressão do sistema Gateway[®] (Invitrogen). As reações de ligação foram realizadas contendo 4µL da reação de PCR purificada, 1µL de solução salina (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) diluída 1:4, e 1µL do vetor TOPO[®], em um volume final de 6µL. Após 16 horas à temperatura ambiente (22-23°C), 1µL da reação de ligação foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* XL1-Blue eletrocompetentes. As bactérias transformantes foram selecionadas em meio de cultura LB sólido (peptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L, ágar 15g/L, pH7,0) contendo o antibiótico canamicina na concentração final de 25µg/mL. Em seguida, a confirmação dos clones positivos para o inserto CAHB12 foi realizada através de PCR de colônia, utilizando-se dos mesmos pares de iniciadores utilizados na reação de isolamento do cDNA. Dois clones contendo o gene homeobox de café foram então escolhidos para seqüenciamento.

A clonagem do gene CAHB12 no vetor binário Gateway[®] pB2GW7 (Karimi *et al.*, 2002) foi realizada através de recombinação. Nesse vetor, o cDNA do gene homeobox foi clonado sob o controle da região promotora 35S, através da recombinação entre as regiões attL1/attR1 e attL2/attR2 dos vetores de entrada e de destinação, pENTR[™]D-TOPO/pB2GW7, respectivamente. As reações de recombinação foram realizadas nas seguintes condições: 1µL da enzima LR Clonase[™] II (Invitrogen), 150ng do vetor de entrada pENTR[™]D-TOPO (contendo o cDNA de cada homeobox de café), 150ng do vetor de destinação pB2GW7 e tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) em um volume final de 5µL. Essa mistura foi incubada por 1 hora a 25 °C. Em seguida, 1 µL de uma solução de proteinase K 2µg/µL foi adicionado à cada reação anterior e uma nova incubação por 10 minutos a 37°C foi realizada. 2µL de reação foram então utilizados para a transformação de células de *E.coli* XL1-Blue eletrocompetentes, e os clones

positivos foram desta vez selecionados em meio LB sólido contendo o antibiótico espectinomicina na concentração final de 50µg/µL.

Os clones positivos foram em seguida confirmados através de reações de PCR de colônia, utilizando os mesmos pares de iniciadores descritos anteriormente neste item. O DNA plasmidial destes clones foi extraído e purificado com o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo as instruções do fabricante, e 1µL de DNA diluído na proporção de 1:100 foi utilizado para a transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 eletrocompetentes. A seleção dos clones positivos foi realizada em meio LB sólido, contendo 100µg/mL dos antibióticos rifampicina e spectinomicina. Após a confirmação através de reações de PCR de colônia, um clone contendo o gene *CAHB12* foi selecionado para a transformação de plantas de *A. thaliana*.

TABELA 1 - INICIADORES UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO E CLONAGEM DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DOS CDNAS DO GENE *CAHB12*

Iniciadores	Seqüência	Orientação
GW11116	5'-caccatggaacaaacaggcta-3'	Direta
11116mon	5'-GTTCTGGAGGCATATGCACTGG-3'	Reversa

EXEMPLO 2 - ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *CAHB12* EM FOLHAS E RAÍZES DE CAFÉ SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO

a. MATERIAL VEGETAL

Os experimentos de estresse hídrico em casa de vegetação foram realizados utilizando-se plantas com seis meses de idade, da espécie *C.arabica*, cvs. 'Catuaí Vermelho IAC44' e 'Bourbon Amarelo IAC J10'. As

plantas foram cultivadas sob condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e fotoperíodo natural, em bandejas contendo 20 plantas cada. A rega das plantas controle foi realizada utilizando-se 500 mL de água por bandeja, em intervalos de um dia. O potencial hídrico (ψ_w) de cada planta foi medido no período antes do amanhecer com o auxílio de uma câmara de pressão tipo Scholander. Durante os experimentos de déficit hídrico, as plantas permaneceram cobertas durante a noite, e essa proteção foi retirada somente no momento em que as medidas de ψ_w foram realizadas, para evitar a interferência da taxa de transpiração nos valores obtidos. O estresse hídrico foi induzido através da interrupção da rega, por 10 dias. Amostras compostas por folhas totalmente expandidas (terceiro par) e raízes laterais foram coletadas em períodos distintos de indução (2,5 e 10 dias). Os experimentos foram realizados em duplicata, e cada amostra foi composta por material proveniente de 5 plantas de café submetidas às mesmas condições. Amostras de plantas cultivadas em condições controle foram coletadas nos mesmos períodos de indução de estresse para comparação. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o momento da extração de RNA.

b. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Amostras compostas por folhas e raízes de café foram pulverizadas em nitrogênio líquido, com o auxílio de pistilo e gral, até obter-se um pó fino. Aproximadamente 100mg de amostra pulverizada foram ressuspensas em 500 μ L do reagente *ConcertTM Plant RNA Reagent* (Invitrogen) refrigerado (4°C), de acordo com as instruções do fabricante. Após 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos, a 12000xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e 100 μ L de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 5M e 300 μ L de clorofórmio

foram adicionados às amostras e misturados por inversão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos, a 12000xg. A fase aquosa foi recuperada, e o RNA total foi precipitado com um volume igual de isopropanol, por 10 minutos, à temperatura ambiente, seguidos de uma etapa
5 de centrifugação a 4°C, por 10 minutos, a 12000xg. O precipitado foi lavado com uma solução de etanol (EtOH) 75%, seco a temperatura ambiente, e dissolvido em 30 µL de água destilada estéril.

Para evitar qualquer contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNaseI (Invitrogen) a 37°C por 15
10 minutos, seguidas por duas extrações com uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), e precipitadas com acetato de sódio (NaOAc) 3M, e EtOH 100%. A concentração e pureza do RNA foram determinadas antes e depois do tratamento com DNaseI com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi verificada
15 em gel de agarose 1%.

A síntese de cDNA foi realizada através da adição de 50µM de iniciadores Oligo (dT₂₄), e 10mM de cada desoxirribonucleotídeo 5' - trifosfato (dNTP) a 1µg de RNA total. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos, e resfriada brevemente em gelo. 2 µL de tampão *First Strand Buffer* 10X, 20mM
20 de dithio-threitol (DTT), e 200 unidades da enzima *Superscript III* (Invitrogen) foram adicionados à mistura anterior até um volume final de 20 µL. Após 1 hora a 50°C, a ação da enzima foi termo-inativada a 70°C por 15 minutos.

c. REAÇÃO DE RT-QPCR

Os pares de iniciadores para amplificação do gene *CAHB12*
25 foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), utilizando-se como critério a amplificação de produtos de tamanho entre 80-100 nucleotídeos, e temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C

(Tabela 2). Análises da curva de dissociação dos produtos amplificados, e corridas em gel de agarose 1% foram realizadas para a confirmação da amplificação de um produto único de PCR. Para a normalização da expressão do gene *CAHB12* foram utilizados como genes de referência os genes *UBI9* (ubiquitina-like), *S24* (proteína ribossomal *S24*) e *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C-2).

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em placas óticas com 96 poços, no termociclador *Chromo 4 Real-time PCR Detector* (BioRad), utilizando-se do fluoróforo *SYBR[®]Green* para monitorar a síntese de dupla fitas de DNA. 0.2µM de cada iniciador, 50µM de cada dNTP, 2µL do tampão de PCR *Taq 10X* concentrado (Invitrogen), $MgCl_2$ 3mM, 1µL de *SYBR[®]Green I* (Molecular Probes) diluído em água (1:10.000), e 0.25 unidades da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) foram adicionados a 10µL de cDNA diluído 1:50, em um volume final de 20µL. A reações foram incubadas por 5 minutos a 94°C, seguidos por 40 ciclos de amplificação de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C, e 15 segundos a 72°C.

Os valores de ciclo de corte (*cycle threshold* - Ct) foram convertidos no programa qBase v1.3.5 (Hellemans *et al.*, 2007) em quantidades relativas normalizadas (NRQ), através da fórmula $NRQ=2^{-\Delta(\Delta CT)}$, em que 2 corresponde à eficiência de amplificação igual a 100%, ΔCt é a diferença entre o Ct da amostra com menor expressão no experimento e o Ct da amostra em questão, e $\Delta\Delta Ct$ corresponde a diferença entre o ΔCt da amostra em condição estressada, menos o ΔCt da amostra em condição controle. O fator de normalização (FN) calculado a partir da expressão dos três genes de referência (*UBI9*, *S24* e *GAPDH*) foi utilizado para a normalização dos dados.

TABELA 2 - PARES DE INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *CAHB12*, *UBI9*, *S24* E *GAPDH* DE CAFÉ.

Gene	Par de iniciadores (direta/reversa)
<i>CAHB12</i>	5'-TGTTTAATCGGGAGGCAAAG-3'/
	5'-GCCCTTTTGTCTGAAACCA-3'
<i>UBI9</i>	5'-AAGAAGGAATCCCCCTGTG-3'/
	5'-ACCTCCACCTCTCAGAGCAA-3'
<i>S24</i>	5'-AGGCTGTTGGGAAAGTTCTTC-3'/
	5'-ACTGTTGGAACCTCGGAATGC-3'
<i>GAPDH</i>	5'- CCGAATGCCATTTTTGTCTT-3'/
	5'-TCCAAACCCAGTTGACTTGC-3'

EXEMPLO 3 – PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS SOBRE-EXPRESSANDO O GENE

5 *CAHB12*

a. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS E SELEÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS

A obtenção de plantas superexpressando os genes *CAHB1* e *CAHB12* foi realizada através do sistema de infiltração da inflorescência mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (*floral-dip*) (Desfeux *et al.*, 2000). Para
 10 isso, uma colônia isolada de *A. tumefaciens* GV3101, contendo o gene *CAHB12* sob o controle do promotor 35S (vetor pB2GW7), foi crescida por 48 horas a 28°C sob agitação de aproximadamente 200rpm, em 2mL de meio LB líquido (peptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L, pH7,0), contendo
 15 100µg/mL do antibiótico rifampicina e 25µg/mL do antibiótico canamicina, ou 100µg/mL do antibiótico espectinomicina, dependendo da construção a ser transformada. Essa cultura foi utilizada para inocular 200mL de meio LB líquido, contendo os mesmo antibióticos presentes na cultura anterior. Após 16

horas de crescimento a 28°C sob agitação, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 4000rpm. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 200mL de uma solução contendo 5% de sacarose e 0,01% do surfactante Silwet L-77. As flores de plantas adultas da espécie *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), foram imersas nessa solução agitando-se levemente. Após 1 minuto, as plantas foram colocadas na posição horizontal em uma bandeja, e cobertas por um filme plástico com o objetivo de manter a umidade. No dia seguinte, o filme plástico foi retirado, e as plantas foram colocadas na posição vertical novamente. Cerca de 12 plantas foram transformadas para cada construção.

As sementes produzidas pelas plantas transformadas foram esterilizadas em uma solução de EtOH 70% e TWEEN 20 0,05% por 10 minutos, e semeadas em meio MS sólido (sais MS 4,6g/L, sacarose 20g/L, glicina 2mg/L; ácido nicotínico 5mg/L, piridoxina-HCl 0,5 mg/L, tiamina-HCl 0,1 mg/L, ágar 8g/L, pH5,8) (Murashige & Skoog, 1962) contendo o herbicida glufosinato sal de amônio (basta) na concentração final de 10 µg/mL. As linhagens transgênicas resistentes foram transferidas para potes contendo o substrato comercial Plantmax® em uma proporção de 3:1 (substrato: vermiculita), e dessa forma cultivadas sob condições de luz (fotoperíodo de 18 horas de luz/6 horas de escuro) e temperatura (22 °C, ±2 °C) controlada. As sementes da geração T0 de plantas contendo o gene *CAHB12* no vetor pB2GW7 foram submetidas novamente à seleção com basta, com o objetivo de identificar aquelas linhagens apresentando uma segregação de 3:1 entre plantas resistentes e sensíveis, indicando a presença de apenas uma inserção de T-DNA. 15-25 plantas resistentes da geração T1 de cada linhagem independente previamente selecionada foram transferidas para potes contendo substrato, e um novo teste de segregação foi realizado com as sementes

produzidas por essas plantas, com o objetivo de identificar as linhagens T2 heterozigotas e homozigotas. As plantas T2 cultivadas em placas apresentando aproximadamente 100% de resistência ao herbicida ou antibiótico utilizado foram transferidas para potes contendo substrato, segundo as condições mencionadas anteriormente, e as sementes T3 produzidas foram então utilizadas para os testes posteriores de tolerância. Para cada teste de segregação foram utilizadas de 50 a 150 sementes.

b. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS SOBRE-EXPRESSADO O GENE *CAHB12*

Aproximadamente 100mg de material vegetal de plantas homozigotas pertencentes à geração T3 das linhagens transgênicas nomeadas de A, B e D foram coletados em nitrogênio líquido e utilizados para o isolamento de RNA segundo o protocolo descrito por Tai e colaboradores, com algumas modificações (Tai *et al.*, 2004). O material vegetal foi pulverizado com o auxílio de microesferas de metal e agitador do tipo vortex, e ressuspensos em 500µL do tampão de extração [uréia 6M, LiCl 3M, 0.01M Tris-HCl (pH8,0), 20mM EDTA (pH8,0)]. As amostras foram misturadas por inversão, e 500µL de uma solução contendo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1 foram adicionados ao tubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000xg, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e uma nova extração com um volume da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi realizada. Ao sobrenadante recuperado, após centrifugação como na etapa anterior, foi adicionado um volume da solução contendo clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 12000xg (4°C), e o RNA foi precipitado com a adição de 1/10 do volume de NaOAc 3M (pH5,2) e 1 volume de isopropanol ao sobrenadante. Os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos, seguidos por

uma etapa de centrifugação a 12000xg, por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi então lavado duas vezes com EtOH 70%, e finalmente ressuspenso em 25µL de água Milli-Q® estéril. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1%.

5 A síntese de cDNA foi realizada conforme descrito anteriormente no item 3.4.2 desta seção. As reações de PCR foram realizadas com os iniciadores GW11116 e 1116mon (Tabela 1) de acordo com as seguintes condições: 1µL de cDNA, 2,5µL do tampão de PCR 10X concentrado, MgCl₂ 2mM, 0,2µM de cada iniciador, 0,8mM de cada dNTP, e 1U da enzima *Taq*
10 *DNA Polymerase* (Invitrogen), em um total de 25µL. Cada reação foi incubada por 3 minutos a 94°C, seguidos por 25 ciclos de amplificação de 25 segundos a 94°C, 25 segundos a 59°C, e 55 segundos a 72°C. Finalmente, uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos foi realizada.

A expressão do gene *Actin11* foi utilizada como controle interno.
15 Para essas reações de amplificação, foram utilizados os iniciadores Ath_ActinII (5'-GGAATCCACGAGACAACCTATAAC-3') na orientação direta, e Ath_ActinII (5'-AGGAATCGTTCACAGAAAATGTTTC-3') na orientação reversa, contendo as mesmas concentrações de reagentes e cDNA descritos no parágrafo anterior. Cada reação foi incubada por 3 minutos a 94°C, seguidos por 25
20 ciclos de amplificação de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C, e 45 segundos a 72°C. Finalmente, uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos foi realizada. Os produtos de PCR foram verificados em géis de agarose 1%.

EXEMPLO 4 - ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO COM PLANTAS TRANSGÊNICAS SOBRE-EXPRESSANDO O GENE *CAHB12*

a. ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO EM PLACAS TRATADAS COM PEG 8000

5 Os ensaios de tolerância ao estresse hídrico em placas tratadas com polietilenoglicol (PEG) 8000 foram realizados de acordo com o protocolo descrito por van der Weele e colaboradores (van der Weele *et al.*, 2000), com algumas modificações (Verslues & Bray, 2004). Sementes de plantas de *A. thaliana* pertencentes às linhagens transgênicas e selvagens foram semeadas
10 em meio de cultura MS contendo metade da concentração de sais, sem sacarose, e suplementado com tampão MES 6mM (sais MS 2,3g/L, glicina 2mg/L; ácido nicotínico 5mg/L, piridoxina-HCl 0,5 mg/L, tiamina-HCl 0,1 mg/L, ágar 8g/L, pH5,7). 20 dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para placas de Petri de tamanho regular (100mm de diâmetro x 20mm de
15 altura), contendo 20mL do meio de cultura MS modificado conforme descrito anteriormente, tratadas previamente com uma solução de PEG8000 (sais MS 2,3g/L, glicina 2mg/L; ácido nicotínico 5mg/L, piridoxina-HCl 0,5 mg/L, tiamina-HCl 0,1 mg/L, tampão MES 6mM, PEG8000 550g/L, pH5,7). Estas placas foram cobertas com 30mL da solução de PEG, com o objetivo de reduzir o
20 potencial hídrico do meio de cultura para -1,2MPa. Após 16 horas de infusão, a solução de PEG foi totalmente retirada com o auxílio de uma pipeta estéril, e 30 plântulas de cada linhagem transgênica e selvagem foram transferidas para o meio tratado.

O material vegetal foi coletado 7 dias após a transferência para o
25 meio tratado com PEG. Foram realizadas ao todo duas réplicas biológicas para cada linhagem transgênica. Em cada experimento, foram coletados dois conjuntos individuais de plântulas, contendo 15 indivíduos cada um. A

quantidade de aldeído malônico (MDA) produzido foi posteriormente monitorada, na tentativa de medir o nível de peroxidação lipídica das plantas sob estresse. Para evitar o efeito da transferência de placas nas medidas de MDA, plântulas transferidas para placas contendo meio de cultura não tratado com PEG foram utilizadas como controle. O material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até o momento da quantificação de MDA.

b. QUANTIFICAÇÃO DE ALDEÍDO MALÔNICO (MDA)

Para a quantificação da produção de MDA, o material previamente congelado foi primeiramente pulverizado em nitrogênio líquido, com o auxílio de microesferas de metal e agitador do tipo vortex. Em seguida, foram adicionados $700\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) 0.1%, previamente refrigerado. A extração com TCA 0,1% foi repetida mais uma vez, e as amostras foram centrifugadas a $12000\times g$ por 10 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi então dividido em dois tubos ($600\mu\text{L}$ em cada). O primeiro tubo continha $600\mu\text{L}$ de solução composta por TCA 20% e hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01%. O segundo tubo continha o mesmo volume ($600\mu\text{L}$) de uma solução composta por TCA 20%, BHT 0,01% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,65%. As amostras foram misturadas, e os tubos incubados a 95°C por 30 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a $12000\times g$, por 5 minutos a 4°C . Os valores de absorbância (Abs) dos tubos contendo a solução TCA 20% e BHT 0,01% foram lidos no espectrofotômetro para os comprimentos de onda 532 e 600nm, enquanto os valores de absorbância para os tubos contendo TCA 20%, BHT 0,01% e TBA 0,65%, foram lidos nos comprimentos de ondas de 440, 532 e 600nm. A solução de TCA 0,1% foi utilizada para calibrar as leituras do aparelho.

Os valores de MDA/mL de tecido processado foram estimados através da seguinte fórmula (Hodges *et al.*, 1999):

$$MDA (\mu\text{mol/L}) = [(A-B)/157000] \times 10^6,$$

$$\text{onde } A = [Abs_{532+TBA} - Abs_{600+TBA}] - (Abs_{532-TBA} - Abs_{600-TBA}),$$

$$\text{e } B = [Abs_{440+TBA} - Abs_{600+TBA}] \times 0,0571.$$

Esses valores foram então transformados em nmol/g através da fórmula:

5 $MDA (\mu\text{mol/L}) \times \text{volume total da extração (igual a 1,4mL)}/\text{peso fresco em Kg.}$

c. ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA EM SOLO – ESTRESSE HÍDRICO SEVERO

Os ensaios de tolerância ao estresse hídrico em potes contendo substrato foram realizados em câmaras de crescimento sob condições de luz (fotoperíodo de 18 horas de luz/6 horas de escuro) e temperatura (22°C, ±2°C)

10 controlada, com uma unidade relativa de aproximadamente 50%. Sementes de plantas de *A. thaliana* pertencentes às linhagens transgênicas sobre-expressando o gene *CAHB12* e selvagens foram semeadas diretamente em potes do mesmo tamanho (8 x 7cm), dispostos em bandejas, contendo aproximadamente a mesma quantidade de substrato (100g) cada (Dezar *et al.*,

15 2005). As bandejas foram, em um primeiro momento, irrigadas à saturação (aproximadamente 2L de água), por 3 horas e, após esse período, o excesso de água foi retirado. Em cada pote, foram semeadas quatro sementes do mesmo genótipo. As bandejas foram então cobertas por um filme plástico, até o momento do surgimento do primeiro par de folhas verdadeiras, sendo retirado

20 em seguida. A partir desse momento, as bandejas não foram mais regadas até a observação do sintoma de murcha constante das plantas selvagens, quando então se procedeu a reidratação das bandejas. O número de sobreviventes ao ensaio foi verificado dois dias após a reidratação. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, sendo analisadas ao todo, um total de 98 plantas do

25 genótipo selvagem, 64 plantas da linhagem transgênica A, 32 plantas da linhagem transgênica B, e 64 plantas da linhagem transgênica D.

d. ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA EM SOLO – ESTRESSE HÍDRICO CONTÍNUO

Estes ensaios foram realizados nas mesmas condições do item 3.9.3, porém com algumas modificações. Após a retirada do filme plástico, as bandejas foram regadas normalmente por 30 dias. A partir deste momento, 1mL de água foi adicionado por dia a cada pote, até a observação do sintoma de murcha constante das plantas selvagens, quando então as bandejas foram reidratadas. O número de plantas sobreviventes foi contabilizado 2 dias após a reidratação. Neste ensaio, as plantas se encontravam em um período mais tardio do desenvolvimento, já no estágio de frutificação. Os ensaios foram realizados em duplicata e um número total de 64 plantas selvagens e 56 plantas de cada linhagem transgênica foram analisados.

EXEMPLO 5 - ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO COM PLANTAS TRANSGÊNICAS SOBRE-EXPRESSANDO O GENE *CAHB12*

Os experimentos de tolerância ao estresse salino foram realizados em placas contendo meio de cultura MS sólido, suplementado com 100 e 150mM de NaCl (Liu *et al.*, 2009). Sementes de plantas transgênicas e selvagens foram semeadas em condições assépticas, e mantidas a 4°C durante quatro dias. Após esse período, as placas foram transferidas para a câmara de crescimento, onde foram mantidas em condições de luz (18 horas de luz/6 horas de escuro) e temperatura controladas (22°C, ±2°C). As taxas de germinação foram medidas sete dias após a transferência das placas para a câmara de crescimento. Foram considerados como positivos para a germinação somente aqueles indivíduos que apresentaram a raiz totalmente inserida no meio de cultura no momento das análises. Para os experimentos realizados na presença de 100mM de NaCl, foram analisadas quatro placas contendo 50 sementes cada, enquanto somente duas placas contendo 50

sementes foram analisadas para os experimentos realizados na presença de 150mM de NaCl.

Medidas de MDA foram realizadas com plântulas germinadas em meio contendo 100mM de NaCl, 15 dias após a transferência das placas para a câmara de crescimento. Este experimento foi realizado em duplicata, e, para cada um, três conjuntos de 10 plântulas foram coletados. Estas amostras foram imediatamente pesadas e congeladas em nitrogênio líquido. Como controle foram utilizadas amostras de plantas cultivadas em meio MS sem a adição de NaCl.

As seqüências ID 1 e ID2 representam o gene *CAHB12*. (A) Seqüência de nucleotídeos codificadora da proteína CAHB12. (B) Seqüência de aminoácidos da proteína CAHB12. A posição do homeodomínio está indicada pela barra negra horizontal acima da seqüência. A posição do zíper de leucina está indicada pela barra horizontal pontilhada.

Abaixo segue a descrição de cada Figura:

FIGURA 1 - Endereçamento nuclear da proteína CAHB12. Folhas de café da espécie *C. arabica* foram bombardeadas com as seguintes construções: proteína GFP sob o controle do promotor 35S (A,B,C) e cDNA completo do gene *CAHB12* fusionado à proteína GFP sob o controle do promotor 35S (D,E,F). A expressão transiente foi observada 24h após o bombardeamento em microscópio confocal, utilizando-se os filtros de fluorescência vermelho (A e D), verde (B e E), e vermelho e verde (C e F). Barras = 10µm.

FIGURA 2 - Padrão de expressão do gene *CAHB12* em raízes laterais de plantas da espécie *C.arabica*, cultivares Catuaí Vermelho (A) e Bourbon Amarelo (B). Os valores de expressão relativa estão indicados no eixo y. Foram coletadas amostras em diferentes tempos de indução: 2 dias (2d), 5 dias (5 d) e 10 dias (10 d). Amostras de plantas mantidas sob condições

controle (Ctrl) foram coletadas em cada tempo experimental para comparação. Abaixo dos gráficos de expressão estão indicadas as médias de ψ_w observadas no momento da coleta do material. Barra de erros = 2EPM (n = 3).

FIGURA 3 - Padrão de expressão do gene *CAHB12* em folhas de plantas da espécie *C.arabica*, cultivar 'Catuaí Vermelho'. Os valores de expressão relativa estão indicados no eixo y. Foram coletadas amostras em diferentes tempos de indução: 2dias (2d), 5 dias (5d) e 10 dias (10d). Amostras de plantas mantidas sob condições controle (Ctrl) foram coletadas em cada tempo experimental para comparação. Abaixo dos gráficos de expressão estão indicadas as médias de ψ_w observadas no momento da coleta do material. Barra de erros = 2EPM (n=3).

FIGURA 4 - Esquema do vetor de destinação pB2GW7 (Karimi *et al.*, 2002). As setas rosas indicam a localização dos genes de resistência para o herbicida glufosinato sal de amônio (Bar) e, os antibióticos, estreptomicina (Sm) e espectinomicina (Sp). A posição do promotor e terminador 35S são indicadas pela seta e pela caixa verdes, respectivamente. A região *ccdB* é indicada pela caixa azul clara, entre as duas regiões de recombinação *attR1* e *attR2*. As caixas vermelhas indicam o T-DNA, flanqueado pelas regiões *right border* (RB) e *left border* (LB).

FIGURA 5 - **(A)** Detecção de transcritos, através de RT-PCR, para o gene *CAHB12* em plantas homozigotas da terceira geração das linhagens transgênicas A, B e D. O nível de expressão do gene *Actin11* (*ACT11*) foi utilizado como controle interno (indicados na parte inferior da figura). **(B)** Medidas de aldeído malônico (MDA) após 7 dias em meio de cultura tratado com PEG8000 (-1,2MPa). As barras de erro correspondem ao erro padrão (EP) obtido a partir de duas repetições contendo 15 plântulas cada. NT – Não transgênica.

FIGURA 6 - Ensaio de sobrevivência ao déficit hídrico severo. Plantas transgênicas superexpressando o gene *CAHB12* e selvagens foram submetidas a condições de estresse hídrico severo, e reidratadas após a observação de sintomas de murcha permanente. No painel superior, a imagem mostra plantas 2 dias após a reidratação. O quadro no painel inferior indica em porcentagem (total = 16 plantas) a taxa de sobrevivência das plantas após reidratação. NT – Não transgênica.

Figura 7 - Ensaio de sobrevivência ao estresse hídrico contínuo. No painel superior, a imagem mostra plantas 2 dias após a reidratação. O quadro no painel inferior indica em porcentagem (total = 16 plantas) a taxa de sobrevivência das plantas selvagens e transgênicas superexpressando o gene *CAHB12* após reidratação. NT – Não transgênica.

Genótipo	Sobreviventes
NT	0%
A	50%
B	25%
D	12,5%

FIGURA 8 - Caracterização de plantas transgênicas sobre-expressando o gene *CAHB12* em ensaios de estresse salino. **(A)** Taxas de germinação sete dias após a transferência das placas para a câmara de crescimento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (DP) calculado para quatro placas, contendo 50 plantas cada, para os experimentos realizados em meio de cultura contendo 100mM de NaCl, e duas placas, contendo 50 sementes cada, para os experimentos realizados com 150mM de NaCl. **(B)** Peso fresco observado nos experimentos com 100mM de NaCl. Cada medida foi realizada para um conjunto de 10 plântulas, 15 dias após a transferência das placas para a

câmara de crescimento. As barras de erro correspondem ao DP observado para um total de seis medidas. NT – Não transgênica.

Genótipo	Sobreviventes
NT	13%
A	88%
B	94%
D	88%

FIGURA 9 - Tolerância ao estresse salino em plantas sobre-expressando o gene *CAHB12*. **(A)** Efeito do tratamento salino em plantas selvagens e transgênicas em meio de cultura contendo 100mM de NaCl, 15 dias após a transferência para a câmara de crescimento. **(B)** Medidas de MDA realizadas em plantas germinadas em meio de cultura contendo 100mM de NaCl, 15 dias após a transferência para a câmara de crescimento. As barras de erro correspondem ao EP calculado a partir de 6 réplicas, contendo 10 plântulas cada. NT – Não transgênica.

REIVINDICAÇÕES

UTILIZAÇÃO DO GENE HOMEBOX DE CAFÉ *CAHB12* NA PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS MAIS TOLERANTES AO DÉFICIT HÍDRICO E ESTRESSE SALINO

5

1- Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de codificar o fator transcricional CAHB12.

2- Molécula de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser uma molécula de RNA mensageiro.

10

3- Molécula de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser uma molécula de cDNA do grupo que compreende as seqüências ID 1 e ID2.

4- Molécula de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ter sido isolada da espécie *Coffea arabica*.

15

5- Vetor compreendendo a molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de ser fusionada à um promotor operacional 35S capaz de induzir a expressão de tal molécula.

20

6- Vetor de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de conferir uma maior tolerância de células hospedeiras ao estresse hídrico e salino, quando comparadas com células não contendo o referido vetor.

7- Planta transgênica, caracterizada pelo fato de ser estavelmente transformada com a molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 3.

25

8- Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de apresentar níveis elevados de tolerância ao estresse hídrico e salino, quando comparada à plantas selvagens não transgênicas.

9- Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de ser uma monocotiledônea.

10- Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de ser uma dicotiledônea.

5 11- Semente de plantas, caracterizadas pelo fato de ser estavelmente transformadas com a molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 3.

10 12- Célula hospedeira caracterizada pelo fato de ser estavelmente transformada com a molécula de ácido nucléico, conforme reivindicação 3.

13- Célula, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de ser uma célula bacteriana, fúngica, vegetal ou animal.

15 14- Método para produção de plantas transgênicas mais tolerantes ao estresse, hídrico e salino, caracterizado pelo fato de sofrer transformação estável de células vegetais com a molécula de ácido nucléico, cuja seqüência se encontra demonstrada na Figura 1, dando origem às plantas transgênicas regeneradas.

FIGURAS

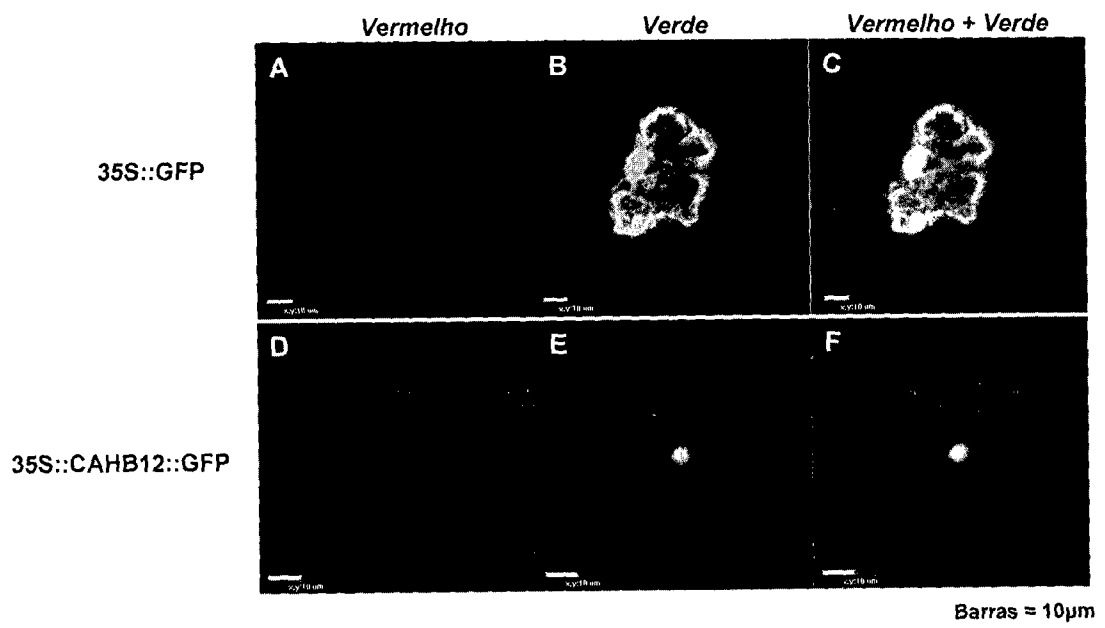


Figura 1

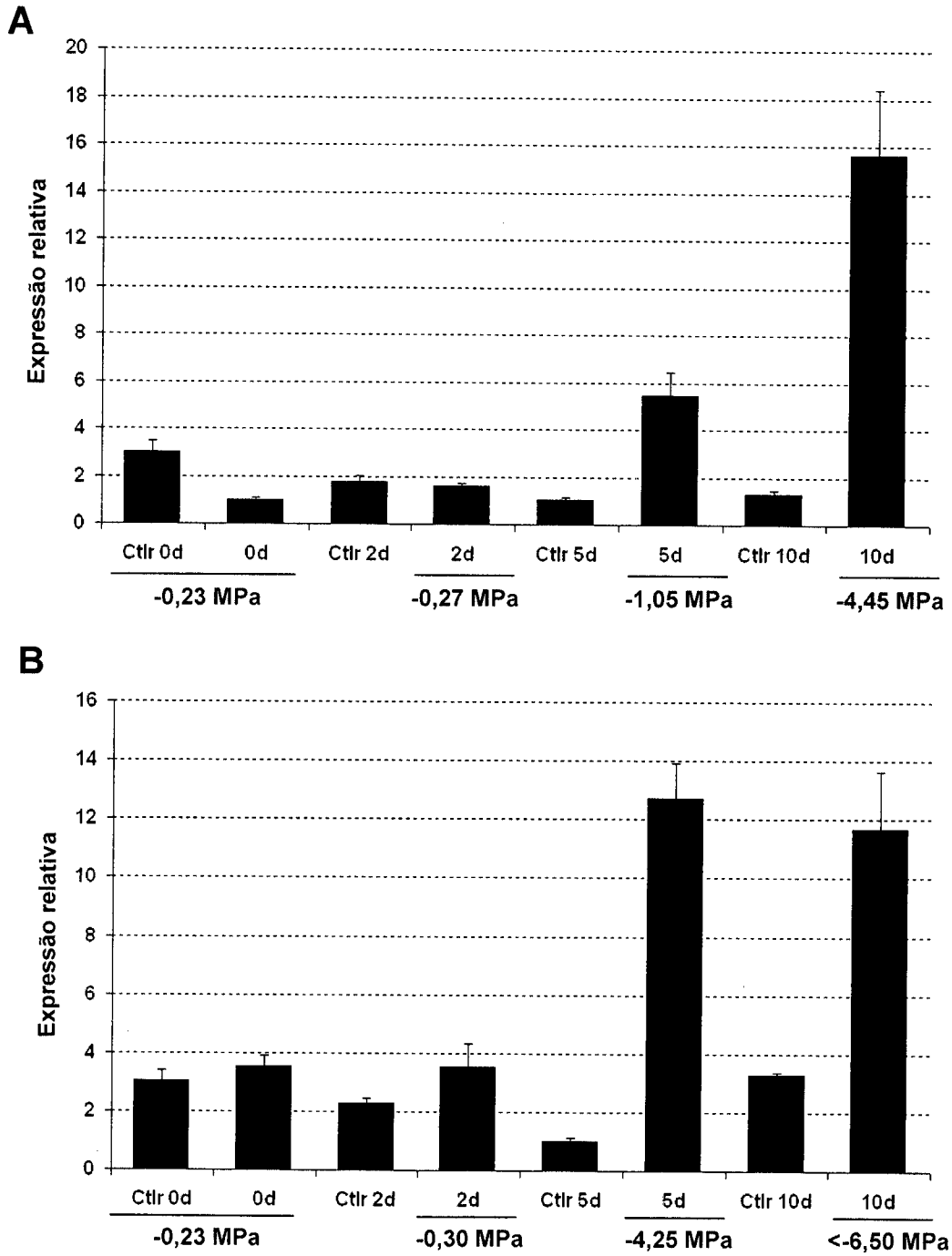


Figura 2

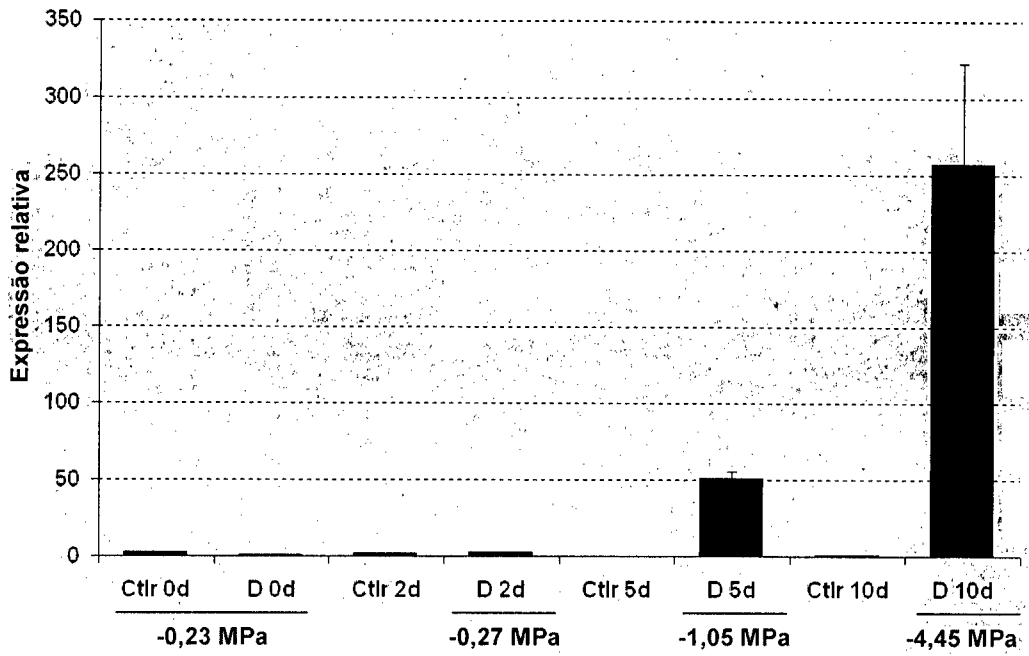


Figura 3

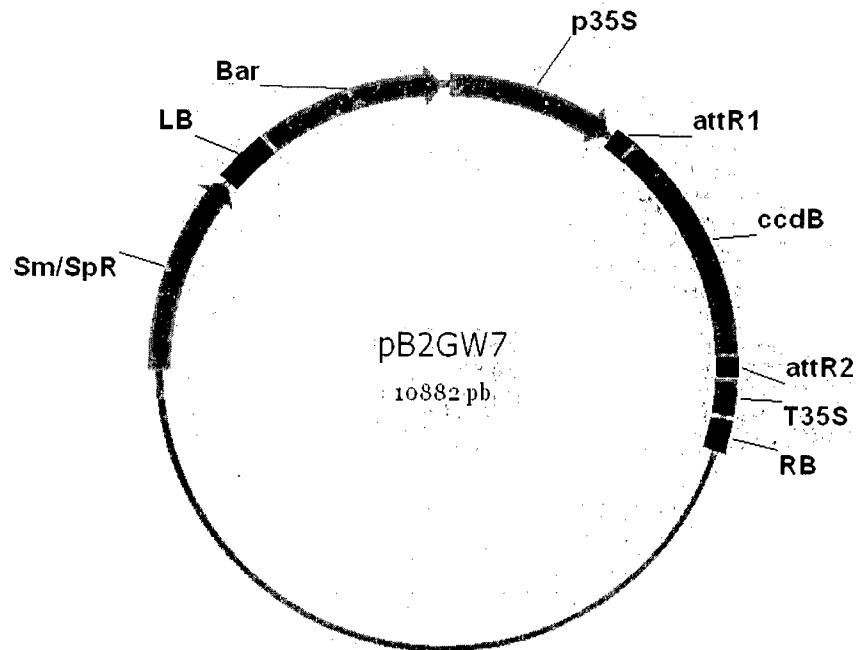


Figura 4

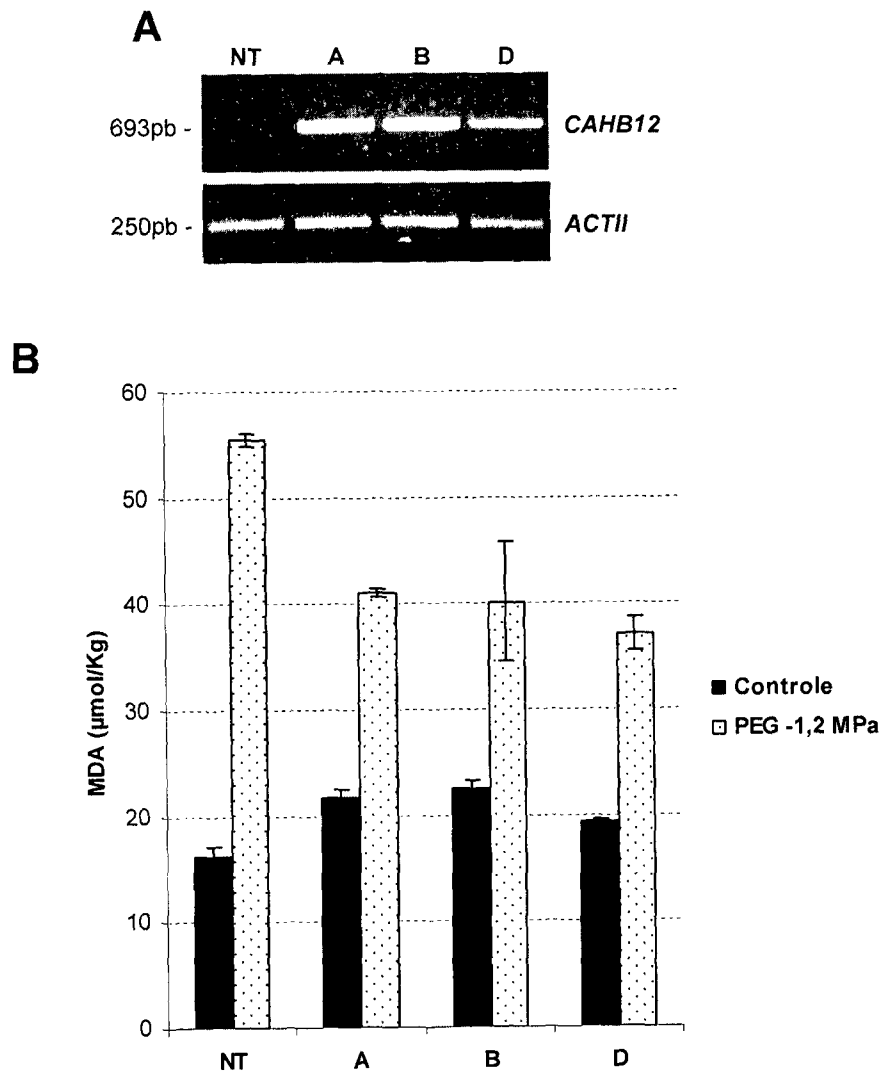
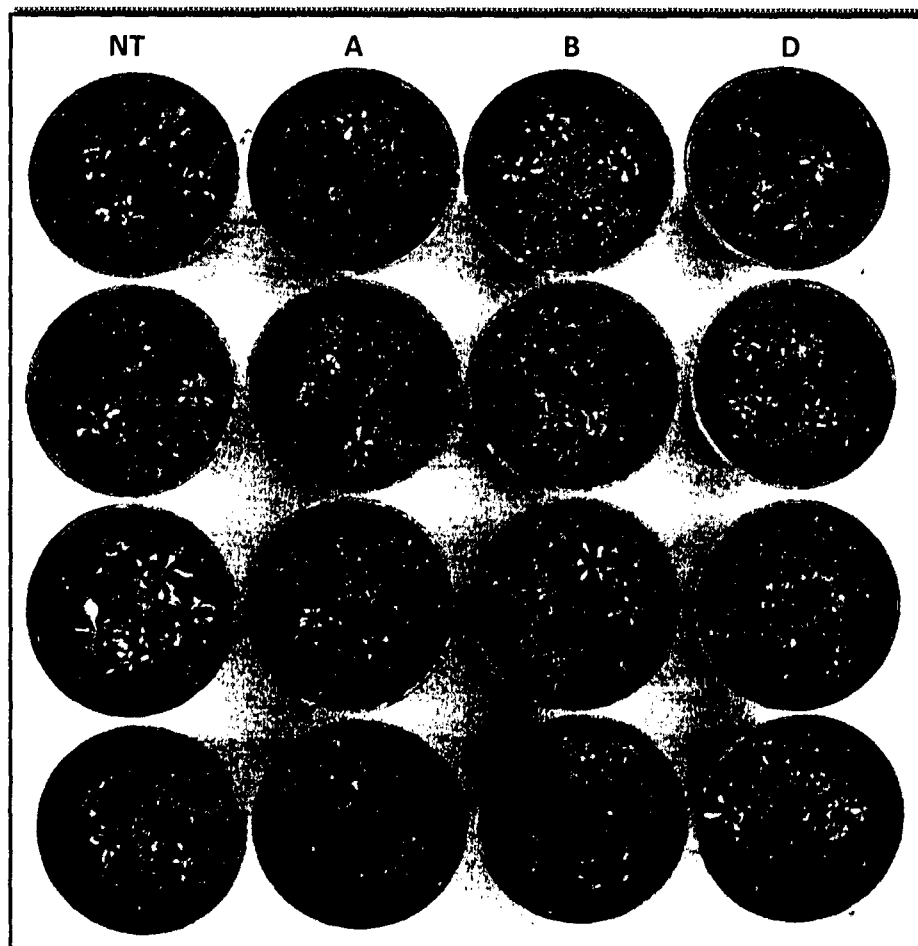
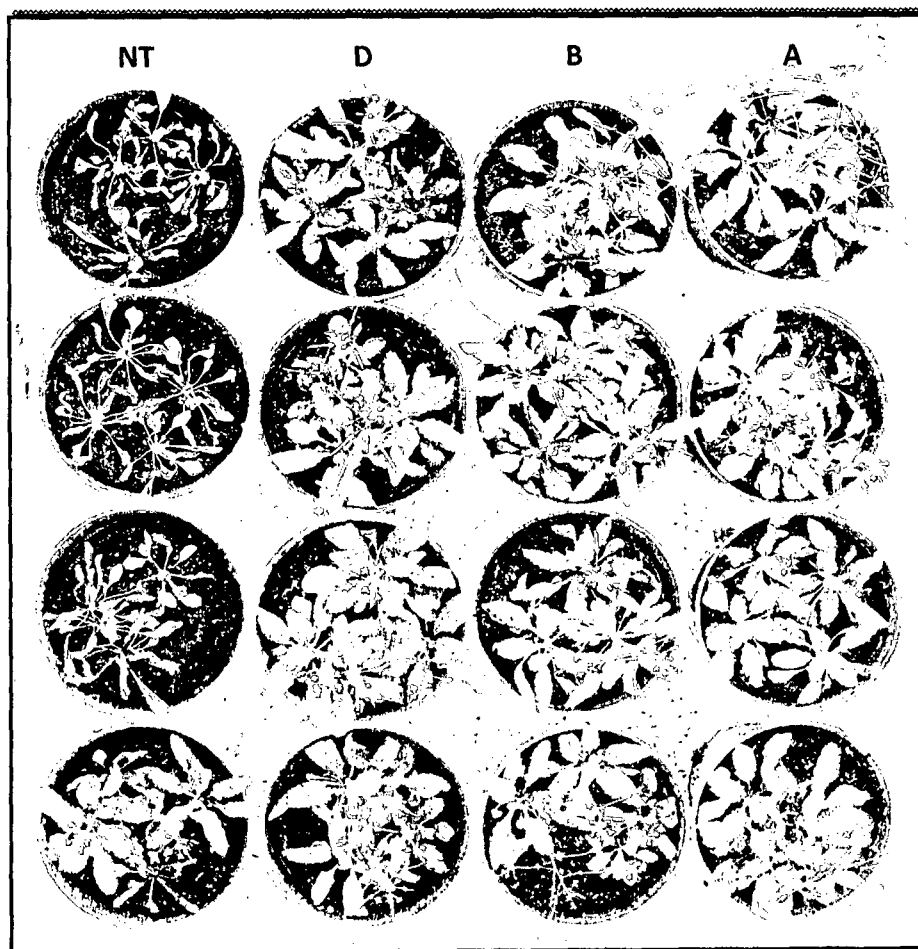


Figura 5



Genótipo	Sobreviventes
NT	0%
A	50%
B	25%
D	12,5 %

Figura 6



Genótipo	Sobreviventes
NT	13%
A	88%
B	94%
D	88%

Figura 7

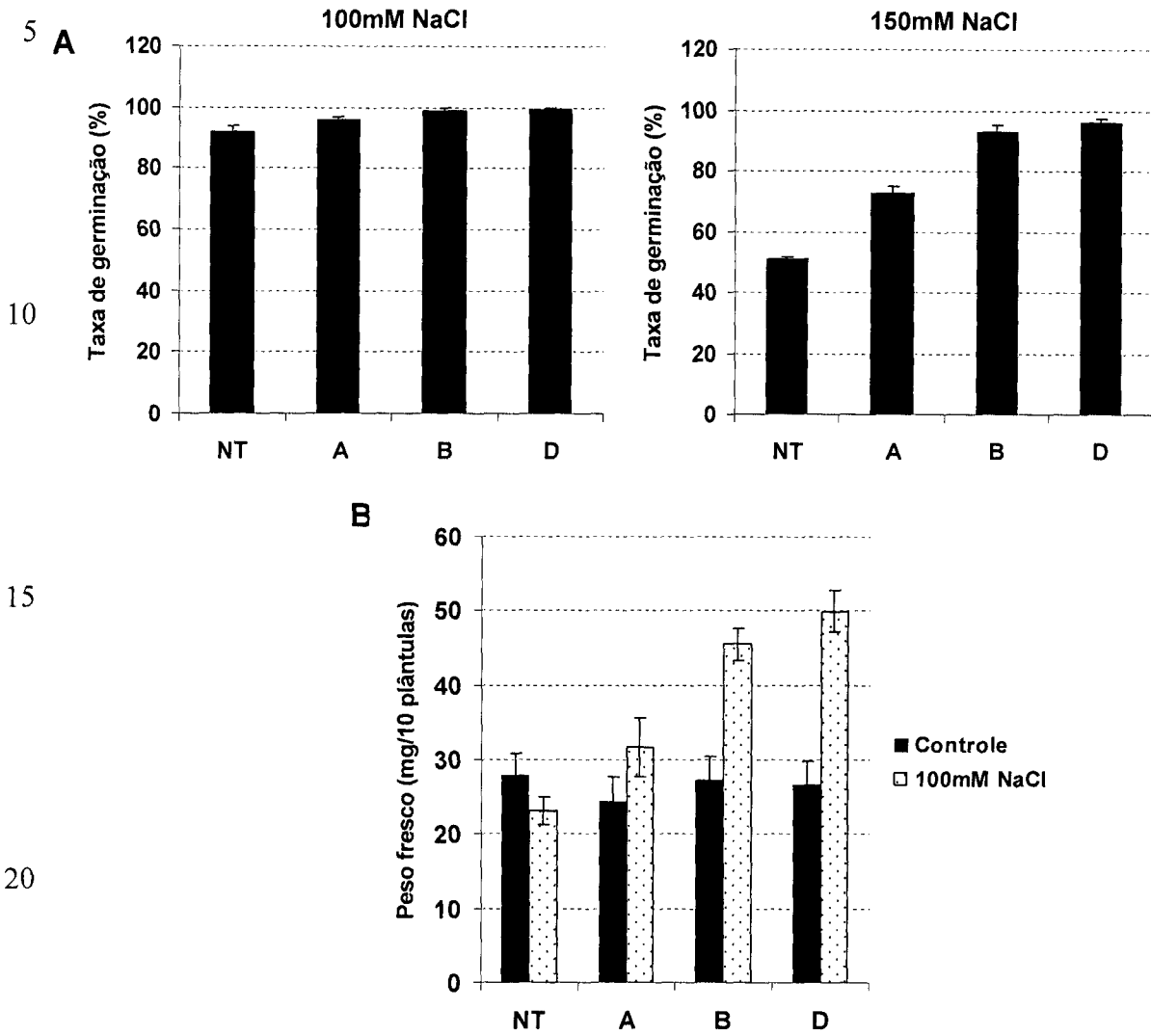


Figura 8

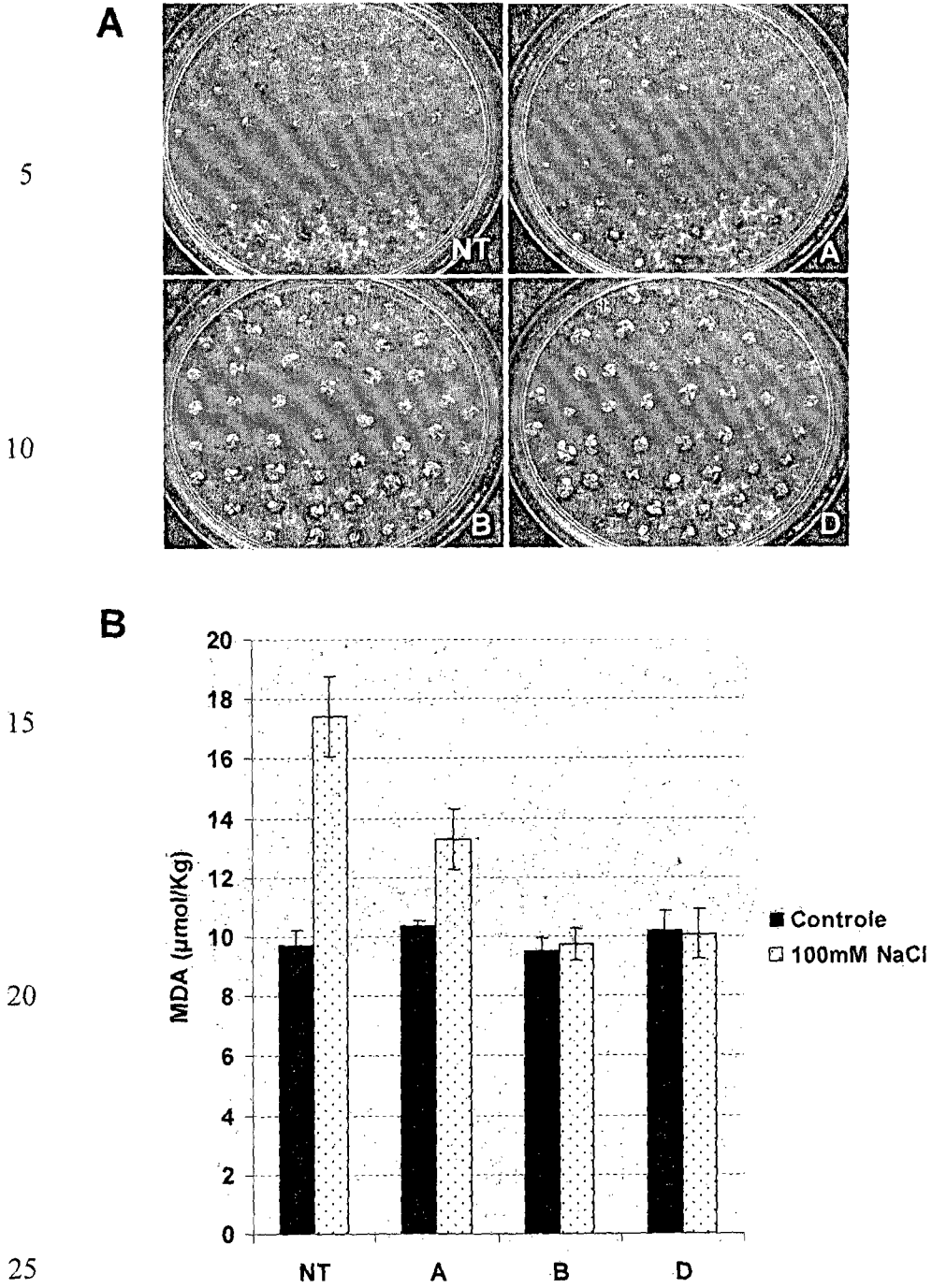


Figura 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/29 (2006.01), C12N 15/82 (2006.01), A01H 5/00 (2006.01), A01H 5/10 (2006.01), C12N 5/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank Acession GT013253 com entrada em 01/09/2009.	1 a 4
Y		5 e 6
X	GenBank Acession GT015128 com entrada em 01/09/2009.	1 a 4
Y		5 e 6
Y	Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 5:2007, Águas de Lindóia – SP. Identificação através de genômica funcional de três genes homeobox envolvidos com a resposta ao estresse hídrico em café a partir de dados do banco genoma café. (p.3, parágrafo 5)	7 a 13.
Y	Plant Biology, Final Program – Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America. Hawaii, 18 to 22/07/2009, Ectopic expression of coffee HD-ZIP CAHB12 confers drought tolerance to <i>Arabidopsis thaliana</i> . the whole document	5 a 13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25/06/2012		Date of mailing of the international search report 29/06/2012
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Two CDs were furnished, one with a nucleotide sequence that corresponds to SEQ ID NO 1 and the other with an amino acid sequence which was identified in field <210> as SEQ ID NO 1, although it corresponds to SEQ ID NO 2.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **14**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 14 claims protection for a method for producing plants characterised by the transformation of plant cells with a nucleic acid molecule, the sequence of which is depicted in figure 1. Considering that figure 1 does not relate to a sequence, it is not possible to determine the nucleic acid molecule involved in the claimed method.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C12N 15/29 (2006.01), C12N 15/82 (2006.01), A01H 5/00 (2006.01), A01H 5/10 (2006.01), C12N 5/00 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

IPC: C12N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

Epodoc

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	GenBank Acession GT013253 com entrada em 01/09/2009.	1 a 4
Y		5 e 6
X	GenBank Acession GT015128 com entrada em 01/09/2009.	1 a 4
Y		5 e 6
Y	Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 5:2007, Águas de Lindóia – SP. Identificação através de genômica funcional de três genes homeobox envolvidos com a resposta ao estresse hídrico em café a partir de dados do banco genoma café. (p.3, parágrafo 5)	7 a 13.
Y	Plant Biology, Final Program – Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America, Hawaii, 18 to 22/07/2009. Ectopic expression of coffee HD-ZIP CAHB12 confers drought tolerance to <i>Arabidopsis thaliana</i> . (todo o documento)	5 a 13

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

25/06/2012

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

290612

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
 +55 21 3037-3663

N° de fax:

Funcionário autorizado

Erika Spangenberg Tarre Borges

N° de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

Quadro I Sequência(s) de nucleotídeo e/ou aminoácido (continuação do ponto 1.c da primeira página)

1. Em relação a qualquer **sequência de nucleotídeo e/ou aminoácido** descrito no pedido internacional, esta pesquisa internacional foi formulada com base na listagem de sequência depositada ou fornecida:
 - a. (meios)
 - em papel
 - em formato eletrônico
 - b. (tempo)
 - no depósito internacional conforme depositado
 - juntamente com o depósito internacional em formato eletrônico
 - subsequentemente a esta Autoridade para o propósito da pesquisa

2. Adicionalmente, no caso em que mais de uma versão ou cópia de uma lista de sequências e/ou tabela(s) relacionada a esta foi depositada ou fornecida, foi entregue a declaração requerida de que a informação contida nas cópias subsequentes ou adicionais é idêntica à depositada, tal como apresentada, ou não ultrapassa o fornecido inicialmente.

3. Comentários adicionais:

Foram apresentados dois CDs, em um consta uma sequência de nucleotídeos correspondente a SEQ ID N°1 e no outro consta uma sequência de aminoácidos que apesar de corresponder a SEQ ID N°2, foi identificada no campo <210> como SEQ ID N°1.

Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2.a), pelas seguintes razões:

1. Reivindicações:

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

2. Reivindicações: 14

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

A reivindicação 14 pleiteia proteção para um método de produção de plantas caracterizado pela transformação de células vegetais com a molécula de ácido nucléico cuja sequência se encontra demonstrada na Figura 1. Tendo em vista que a Figura 1 não se refere a uma sequência, não é possível determinar qual molécula de ácido nucléico está envolvida no método pleiteado.

3. Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1. como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2. como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3. como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4. as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

Observações da reclamação

- as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.
- as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.
- o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.